



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Discipline ou spécialité : Physiologie cellulaire intégrée – Physiopathologie

Présentée et soutenue par Sara LAURENCIN-DALICIEUX

Le 3 Novembre 2010

Titre :

RÔLE DE L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE ET DE SON RÉCEPTEUR LPA₁ DANS LE DÉVELOPPEMENT OSSEUX ET DENTAIRE : EFFET PARACRINE DANS LE CONTRÔLE DE L'OSTÉOGENÈSE ET LA CÉMENTOGENÈSE

JURY

Pr Hugues CHAP
Dr Isabelle GENNERO
Pr Gérard MAUCO
Dr Olivier PEYRUCHAUD
Pr Jean Pierre SALLES
Pr Henri TENENBAUM

Examineur
Examineur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Rapporteur

Ecole doctorale : Biologie – Santé – Biotechnologies

Unité de recherche : INSERM U563, Département LML, CPTP

Directeur(s) de Thèse : Pr Jean Pierre SALLES, Dr Isabelle GENNERO



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Discipline ou spécialité : Physiologie cellulaire intégrée – Physiopathologie

Présentée et soutenue par Sara LAURENCIN-DALICIEUX

Le 3 Novembre 2010

Titre :

RÔLE DE L'ACIDE LY SOPHOSPHATIDIQUE ET DE SON RÉCEPTEUR LPA₁ DANS LE DÉVELOPPEMENT OSSEUX ET DENTAIRE : EFFET PARACRINE DANS LE CONTRÔLE DE L'OSTÉGENÈSE ET LA CÉMENTOGENÈSE

JURY

Pr Hugues CHAP
Dr Isabelle GENNERO
Pr Gérard MAUCO
Dr Olivier PEYRUCHAUD
Pr Jean Pierre SALLES
Pr Henri TENENBAUM

Examineur
Examineur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Rapporteur

Ecole doctorale : Biologie – Santé – Biotechnologies

Unité de recherche : INSERM U563, Département LML, CPTP

Directeur(s) de Thèse : Pr Jean Pierre SALLES, Dr Isabelle GENNERO

A Thomas, mon petit prince,
A Timothée, notre petit loup,
A notre Lilly-puce,
A Eleanor, notre mini-puce,
Sans vous et votre patience, je n'y serais pas arrivée...

A mes parents, à Danielle, Madeleine et Gabrielle
qui ont toujours été là pour moi

A ma famille, à Anne,

A mes amis

A Monsieur le Docteur Olivier Peyruchaud :

Je suis honorée que vous ayez accepté de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour votre disponibilité, vos conseils et votre rigueur scientifique. Soyez assuré de toute mon estime et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Hughes Chap :

Je suis très sensible à l'honneur que vous m'avez fait d'accepter de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

A Monsieur la Professeur Gérard Mauco :

Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail ainsi que pour les remarques que vous avez formulées pour parfaire le manuscrit. Soyez assuré de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Henri Tenenbaum :

Je suis très touchée que vous ayez accepté d'être le rapporteur et de juger ce travail. Je suis honorée de votre présence dans ce jury ainsi que de l'intérêt que vous avez porté à ce travail et que vous portez à la recherche en Odontologie.

A Monsieur le Professeur Jean Pierre Salles :

Je vous remercie d'avoir accepté de diriger ce travail de thèse. Vos connaissances et votre implication m'ont permis de progresser dans ce travail. Soyez assuré de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le Docteur Isabelle Gennero :

Vos conseils, votre implication et votre enthousiasme m'ont permis d'aboutir à ce travail de thèse. Je vous remercie pour l'aide et la confiance que vous m'avez témoignée tout au long de cette thèse.

A l'équipe du Professeur Gérard Brunel, à Jackie, à Philippe, à Ronan, à Damien, à Farida avec qui se travail a débuté. C'est grâce à vous que j'ai été piquée du virus de la recherche. Veuillez trouver ici l'expression de tous mes remerciements pour ces bons moments passés au 5^{ème} entre microscope et machine à café ou à tisane.

A Françoise, Marianne, Arnaud et Thomas qui m'ont accueillie au CRC pendant mon M2R avec qui nous avons bien rigolé entre critiques gastronomiques, de séries télé et de la nouvelle Star. A ce déménagement vers le bâtiment C de l'INSERM, à la collection de jaquettes de tablettes de chocolat, à la tentative de sauvetage d'un congélateur -80° à +26°, à toutes ces petites souris..., à la Piña Colada/Sushi et à la sauce gribiche et aux sorbets de Françoise. Merci pour votre soutien sur tous les plans.

A Isabelle, Nicolas, Emmanuelle, Elvire, Stéphanie, Nicole, Clotilde, Véronique, Anne, Yvette, à l'U563 et aux membres du Bâtiment C qui m'ont aidée tant au niveau scientifique que technique, encadrée et soutenue dans ce travail jusqu'au bout. A la découverte que fondant au chocolat et M&M's font toujours bon ménage pour remonter le moral.

A Cendrine, à mes amis dont les chico-killers et mes collègues qui m'ont encouragée dans ce travail.

A J. Chun et son équipe pour la souris LPA₁^(-/-) sur laquelle s'est porté ce travail.

A L. Vico et son équipe de l'U890/IFR143 de St Etienne, pour leur aide et support technique de microCT.

A D. Laurencin pour sa disponibilité, son soutien et sa connaissance de la spectroscopie à Infrarouge. En attente d'autres collaborations...

A R.O.C. Oreffo qui a été parmi les premiers à initier ce travail sur le LPA et l'os.

A Ph. Bourrin de l'Etablissement Français du Sang pour sa connaissance des cellules souches mésenchymateuses humaines.

A A. Tokumura pour sa collaboration dans le dosage du LPA dans le sérum.

A l'animalerie de l'IFR 30 qui s'est occupée de l'élevage et à la plateforme d'imagerie de l'hôpital.

A M. Tauber et à la Société Française d'Endocrinologie et de Diabétologie Pédiatrique qui m'a permis d'être financée pour une partie de ma thèse.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	12
ABREVIATIONS	14
RESUME	17
ABSTRACT	18
INTRODUCTION	19
CHAPITRE I	21
Le développement du tissu osseux	22
1- Morphologie du tissu osseux :	22
1.1- Macroscopiquement	22
1.2- Microscopiquement	22
2- Composition de l'os :	23
2.1- La matrice extracellulaire	23
2.2- Les cellules	23
3- Mécanismes de l'ostéogenèse :	25
3.1- Ossification membranaire	26
3.2- Ossification endochondrale	27
3.3- Régulation de l'ossification endochondrale	30
3.3.1- Progéniteurs mésenchymateux et plaque de croissance	30
3.3.2- Facteurs impliqués dans la régulation de l'ossification endochondrale	31
3.3.2.1- Ihh, PTHrP et l'AMPc	31
3.3.2.2- FGFR3 et GMPc	33
3.3.2.3- Les Bone Morphogenetic Protein (BMP)	34
3.3.2.4- Les facteurs de transcription	37
3.4- Dynamique du cartilage de croissance	39
4- Le remodelage osseux	40
4.1- Phase de résorption	41

4.2- Phase de formation	43
4.3 Facteurs influençant la masse osseuse	46
 Le développement radiculaire dentaire et parodontal	 48
1. Cinétique de l'édification radiculaire	49
2- Les différents composants du parodonte :	57
2.1- La gaine épithéliale de Hertwig-von-Brünn	57
2.1.1- Origine	57
2.1.2- Rôle et devenir	59
2.2- Le ciment :	60
2.2.1- Généralités	60
2.2.2- Origine et formation	61
2.2.3- Les cellules folliculaires	63
2.2.4- Les cellules cémentoblastiques	63
2.2.5- Physiopathologie du ciment	65
2.3- L'os alvéolaire	66
2.4- Le desmodonte ou ligament parodontal	67
2.5- le parodonte superficiel ou gencive	69
3- Facteurs de croissance et de signalisation	70
 L'acide lysophosphatidique (LPA)	 74
1- Formule chimique	74
2- Localisation du LPA	75
3- Métabolisme du LPA	75
4- Les récepteurs du LPA	78
4.1- LPA ₁	80
4.2- LPA ₂	81
4.3- LPA ₃	82
4.4- LPA ₄	83
4.5- LPA ₅	84
4.6- P2Y ₅	85
4.7- P2Y ₁₀	85
4.8- GPR87	85

5- Physiopathologie du LPA	86
5.1- LPA et système vasculaire	86
5.2- LPA et cicatrisation	87
5.3- LPA et système nerveux	87
5.4- LPA et système reproducteur	89
5.5- LPA et obésité	90
5. 6- LPA et cancer	90
5. 7- LPA et différenciation ostéo-chondrocytaire	91
5. 8- LPA et développement dentaire	93
 CHAPITRE II : Partie Expérimentale	95
1- Travaux préliminaires : Implication des BMPs et de leurs récepteurs dans le développement parodontal et la différenciation des cellules folliculaires dentaires.	96
2- Le récepteur 1 de l'acide lysophosphatidique LPA₁ est impliqué dans le développement osseux et l'ostéogenèse	102
3- LPA et développement radiculaire	140
3.1- Méthodes	140
3.2- Résultats et Discussion	142
 CONCLUSIONS-PERSPECTIVES	148
BIBLIOGRAPHIE	152
ANNEXE	166

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures :

Fig. 1: Développement squelettique

Fig. 2: Différenciation des cellules progénitrices mésenchymateuses par Wnt et Ihh

Fig. 3: Développement osseux endochondral de la phase de condensation mésenchymateuse à la phase mature de la plaque de croissance

Fig. 4: Structure de la plaque de croissance

Fig. 5: Représentation schématique du rôle des facteurs systémiques, localement sécrétés et de transcription impliqués dans la régulation de la prolifération et de l'hypertrophie des chondrocytes au cours de l'ossification endochondrale

Fig. 6: Contrôle cellulaire de la prolifération et de la différenciation chondrocytaire de la plaque de croissance

Fig. 7: Voie de signalisation des BMPs Smad dépendante

Fig. 8: Les différentes voies en aval des BMPRs

Fig. 9: Wnt et Ihh dans la différenciation ostéoblastique des cellules ostéochondrales

Fig. 10: Les différentes phases du remodelage osseux

Fig. 11: Action de RANK, RANK-L et OPG dans la résorption osseuse

Fig. 12: Etapes de prolifération et de différenciation de la lignée ostéoblastique

Fig. 13: Régulation de la masse osseuse et de l'appétit par la leptine

Fig. 14: Représentation schématique d'une molaire mandibulaire

Fig. 15: Stade I : mise en place de la G.E.H.

Fig. 16: Stade II : début de l'édification radiculaire

Fig. 17: Stade III : édification du premier tiers radiculaire

Fig. 18: Stade IV : édification du second tiers radiculaire

Fig. 19: Représentation schématique du développement radiculaire de la 1^{ère} molaire mandibulaire de souris

Fig. 20: Représentation schématique de l'initiation de la formation radiculaire

Fig. 21: Evolution des languettes épithéliales diaphragmatiques chez les pluriradiculées

Fig. 22: Image en microscopie électronique à transmission d'un cémentoblaste

Fig. 23: Représentation schématique de l'organisation séquentielle des fibres du ligament parodontal

Fig. 24: Représentation schématique des fibres

- Fig. 25:** Représentation schématique de l'architecture de la gencive saine
- Fig. 26:** Schéma récapitulatif de l'implication des BMP dans le développement radiculaire
- Fig. 27:** Différentes espèces de LPA
- Fig. 28:** Production de LPA par la voie de l'autotaxine/lysoPLD
- Fig. 29:** Voies possibles de production du LPA dans les plaquettes actives
- Fig. 30:** Homologies entre récepteurs apparentés aux récepteurs du LPA
- Fig. 31:** Voies de signalisation générales impliquant le LPA
- Fig. 32:** Structure du gène du LPA₁
- Fig. 33:** Principales voies de signalisation en aval de LPA₁
- Fig. 34:** Structure du gène du LPA₂
- Fig. 35:** Structure du gène du LPA₃
- Fig. 36:** LPA et cellules nerveuses
- Fig. 37:** Voie de signalisation mettant en jeu P2X7-LPA
- Fig. 38:** Représentation schématique des effets de LPA/autotaxine sur la progression de métastases osseuse ostéolytiques
- Fig. 39:** Schéma représentant la technique de *scraping* sur une molaire
- Fig. 40:** Immunofluorescence des cémentoblastes cultivés in vitro
- Fig. 41:** Profil d'expression de la BSP, l'ostéopontine, la proBMP-2 et la CAP
- Fig. 42:** Phénotype cranio-facial des souris LPA₁^(-/-) et témoin
- Fig. 43:** Phénotype dentaire des souris LPA₁^(-/-)
- Fig. 44:** Spectroscopie à Infrarouge des dents de souris LPA₁^(-/-) et témoin
- Fig. 45:** Immunolocalisation de LPA₁, BMP-2 et BMP-3 au niveau du parodonte des souris LPA₁^(-/-) et témoin
- Fig. 46:** Effet des EMD et du milieu ostéogénique sur les mBMSC témoin
- Fig. 47:** Implication du LPA₁ dans le contrôle de la masse osseuse

Tableau :

Tableau 1: Facteurs impliqués dans la prolifération et la différenciation ostéoblastique

ABBREVIATIONS

AMPc: AMP cyclique
ATX: autotaxine
BMP : *Bone Morphogenetic Protein*
BMPR: *Bone Morphogenetic Receptor*
mBMSC: *murine Bone Marrow Stromal Cells*
BSP: *Bone Sialoprotein*
CAP: *Cementum Attachment Protein*
CDMP: *Cartilage Derived Morphogenetic Protein*
CNP: *C-type Natriuretic Protein*
ColI: collagène de type I
COX: Cyclo-oxygénase
CP: *Cementum Protein*
CRE: *cyclic AMP response element*
DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
EAE: Epithélium Adamantin Externe
EAI: Epithélium Adamantin Interne
EGF: *Epithelial Growth Factor*
EMD: *Enamel Matrix Derivative*
FGF: *Fibroblast Growth Factor*
FGFR: *Fibroblast Growth Factor Receptor*
GEH: Gaine Epithéliale d'Hertwig
GH: *Growth Hormone*
GMPc: GMP cyclique
GPCR: *G Coupled receptor Protein*
IGF1: *Insulin-like Growth Factor1*
IFN: Interféron
Ihh: *Indian hedgehog*
IL: Interleukine
IP: Inositol-phosphate
LCAT: *lecitincholestérol acyltransférase*
LDL: *Low Density Lipoproteins*
LPA: *Lysophosphatidic Acid*

LPA₁: *Lysophosphatidic Acid receptor 1*
LPA₁^(+/-) : souris hétérozygotes pour le LPA₁
LPA₁^(-/-) : souris invalidées pour le LPA₁
LPA₂ : *Lysophosphatidic Acid receptor 2*
LPA₃ : *Lysophosphatidic Acid receptor 3*
LPA₄ : *Lysophosphatidic Acid receptor 4*
LPA₅ : *Lysophosphatidic Acid receptor 5*
LPC: Lysophosphatidyl Choline
LPP: lipides phosphate phosphohydrolases
Lrp5: *lipoprotein related peptide 5*
MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinase*
M-CSF: *Macrophage-Colony Stimulating Factor*
MEF: *Mouse Embryonic Fibroblast*
MEMα: *Modified Eagle Medium alpha*
MCP-1: *Monocyte Chemotactic Protein 1*
MIF: *Macrophage migration Inhibitory Factor*
NPR: *Natriuretic Peptide Receptor*
OC: *Osteocalcin*
OM: *Osteogenic Medium*
OPG: Ostéoprotégérine
OPN: Ostéopontine
OPPG: *Osteoporosis Pseudoglioma*
Osx: Ostérix
PA: *Phosphatidic acid*
PAF: *Platelet Activating Factor*
PDGF: *Platelet Derived Growth Factor*
PG: Prostaglandine
PI3K: Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PKA: Protéine Kinase A
PLA: Phospholipase A
sPLA: Phospholipase A sécrétoire
PLC: Phospholipase C
PLC: Phospholipase C
PLD: Phospholipase D

Ptc-1: Patched-1

PTH: *Parathyroid Hormone*

PTHrP: *Parathyroid Hormone-related Peptide*

PTHR1: *Parathyroid Hormone-related Peptide receptor 1*

RANK: *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B*

RANK-L: *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B- Ligand*

RCPG: Récepteur Couplé aux Protéines G

ROCK: *Rho associated kinase*

RT-PCR: *Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction*

Runx2/Cbfa1: *Runt-related transcription factor 2*

Shh: *Sonic hedgehog*

Smad: apparentés aux protéines SMA (*small body size*) et MAD (*mother against dpp*)

Smo: Smoothened

Sox9: *SRY (sex determining region Y)-box 9*

SRE: *Serum Response Element*

STH: *Somatotrop Hormone*

SVF: sérum de veau fœtal

TGF β : *Transforming growth factors β*

TNF α : *Tumor Necrosis Factor α*

TRAP: *Tartrate Resistant Acide Phosphatase*

TRLC: *Tooth Root Lining Cells*

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

Wnt: *Wg (wingless,) et Int (integration site)*

RESUME

L'acide lysophosphatidique (LPA) est un lipide endogène bioactif qui joue un rôle important comme médiateur cellulaire et facteur de croissance. Il est désormais bien connu que le LPA médie ses effets majeurs en se liant à des récepteurs couplés à des protéines G (RCPG). Il existe 5 RCPG spécifiques du LPA actuellement décrits LPA₁₋₅, homologues de récepteurs d'autres lysolipides majeurs tels que la sphingosine-1-phosphate, mais aussi des récepteurs des cannabinoïdes ou du récepteur du PAF (*Platelet Activating Factor*) plus lointainement apparentés. Le LPA et son récepteur LPA₁ jouent un rôle important dans plusieurs contextes physiopathologiques, notamment par voie paracrine.

Le LPA et son récepteur sont impliqués dans la différenciation ostéoblastique et la formation osseuse. Nous avons dans un premier temps essayé de préciser le rôle du récepteur LPA₁ in vivo en étudiant le phénotype de la souris invalidée pour le LPA₁ (LPA₁^(-/-)). L'étude de ces souris montre des défauts osseux et une diminution de la masse osseuse. Elles présentent un retard de croissance et des anomalies costales et au niveau de leur cartilage de croissance. L'analyse histologique et par μ CT suggère une altération de l'ossification endochondrale. Par ailleurs, les cellules mésenchymateuses des souris LPA₁^(-/-) ont une vitesse de prolifération diminuée et montrent un retard dans la différenciation osseuse.

Nous avons également des arguments suggérant que le LPA et LPA₁ sont impliqués dans le développement dentaire et la cémentogenèse. Les résultats sur coupes de molaire mandibulaire de souris LPA₁^(-/-) montrent des anomalies au niveau de la racine dentaire. La longueur de la racine est plus courte, l'épaisseur du ciment et de l'os alvéolaire interradiculaire est réduite et la composante ligamentaire du parodonte semble plus importante. Il semble qu'il y ait une différence d'expression des BMP-2 et -3 chez la souris LPA₁^(-/-) et l'analyse des ces dents par spectroscopie à infra-rouge montre une phase minérale moins importante pour la souris LPA₁^(-/-).

En conclusion, il semblerait que le récepteur LPA₁ influencerait quantitativement et qualitativement non seulement le développement osseux endochondral mais aussi le développement dentaire.

ABSTRACT

Lysophosphatidic acid (LPA) is a lipid mediator that acts in paracrine and autocrine systems via interaction with a subset of G protein-coupled receptors (GPCRs). LPA promotes cell growth, motility, and differentiation and has been shown to be implicated in a variety of developmental and pathophysiological processes. At least 5 LPA receptor subtypes have been identified to date, LPA₁-LPA₅. Several studies have suggested that the local production of LPA and its receptor LPA₁ by tissues and cells contributes to paracrine regulation.

A complex interplay between LPA and its receptors is also believed to be involved in the regulation of osteoblast differentiation and bone formation. The role of the LPA₁ receptor has to date not been extensively examined with regard to bone formation in vivo. We attempted to clarify the role of the LPA₁ receptor in vivo through defining the bone phenotype of LPA₁^(-/-) mice. These mice demonstrated bone defects and low bone mass, highly indicative of an important role played by LPA₁ in osteogenesis. LPA₁^(-/-) mice presented with growth and costal abnormalities, which also highlights specific roles of LPA₁ during bone development. μ CT and histological analysis suggested altered endochondral ossification is. Finally, bone marrow mesenchymal progenitors from LPA₁^(-/-) mice demonstrated a decreased proliferation rate and delayed osteoblastic differentiation process.

We also have arguments suggesting that LPA and LPA₁ are involved in tooth root development and cementogenesis. The histological results on LPA₁^(-/-) mouse mandibular molars display root anomalies such as shorter roots, decreased cementum thickness and interradicular alveolar bone. Immunohistochemical expression of BMP-2 and -3 also seems modified and infra-red spectroscopy analysis shows a decrease in the mineral phase of LPA₁^(-/-) mice teeth.

Taken together these results suggest that LPA₁^(-/-) strongly influences both bone and cementum development quantitatively and qualitatively. This may be in a manner that involves paracrine pathways.

Introduction

J'ai débuté mes travaux expérimentaux dans le laboratoire en étudiant l'implication des *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) dans le développement radiculaire et parodontal au niveau de la première molaire mandibulaire de la souris. J'ai personnellement participé à ces expérimentations qui nous ont permis de définir un modèle de différenciation cémentoblastique à partir de précurseurs mésenchymateux situés dans le follicule fibreux dentaire. Les BMP et leurs récepteurs sont largement impliqués dans ce processus de différenciation (1, 2). Les publications relatives à ces travaux (signature en deuxième auteur) sont en annexe.

A la suite de ces travaux sur les BMP et les cellules folliculaires j'ai décidé d'étudier un autre facteur qui pourrait être impliqué dans le processus de développement parodontal et de différenciation des cellules folliculaires dentaires, l'acide lysophosphatidique (LPA).

Le LPA est un facteur de croissance original, historiquement très présent dans la thématique de l'Unité INSERM 563 de Toulouse. C'est dans ce contexte que j'ai essayé de préciser le rôle du LPA d'une part dans le développement osseux et d'autre part dans le développement parodontal. Ces deux processus de différenciation ont de nombreux facteurs communs. Ce travail de thèse a fait l'objet d'une collaboration étroite entre l'U563 et la faculté de Chirurgie Dentaire de Toulouse.

Le rôle du LPA dans le développement osseux est encore imparfaitement décrit, en particulier en ce qui concerne l'implication de son récepteur LPA_1 , qui joue un rôle à la fois dans la différenciation ostéoblastique et l'ostéoclasie (3-6). Afin d'étudier le LPA_1 , j'ai pu disposer de souris invalidées pour le gène du LPA_1 ($LPA_1^{(-/-)}$) produites par J. Chun (7). J'ai réalisé une analyse histologique et j'ai pu mettre en culture les cellules mésenchymateuses de moelle des souris témoin et $LPA_1^{(-/-)}$. Les résultats de ce travail, associés à ceux de l'analyse par μ CT montrent que le LPA_1 est impliqué dans l'ossification endochondrale et l'ostéoformation. Les souris $LPA_1^{(-/-)}$ présentent des anomalies au niveau de leur cartilage de croissance ainsi qu'un retard dans les processus de minéralisation.

En ce qui concerne le développement parodontal, j'ai repris le modèle d'étude de la première molaire mandibulaire de la souris et réalisé l'analyse histo-morphométrique de la racine au cours de son développement. J'ai aussi initié la différenciation de ces cellules mésenchymateuses de souris par les facteurs de croissance initialement étudiés, les BMP, retrouvés dans l'EMD (enamel matrix derivative). Les résultats démontrent l'implication du

LPA₁ dans le développement parodontal. En outre, les racines et les dents des souris LPA₁^(-/-) sont moins minéralisées.

Dans un premier chapitre, je vais exposer les données relatives au processus d'ostéogenèse, au développement parodontal puis à la biologie du LPA et du LPA₁.

Dans un second chapitre, je présenterai les résultats expérimentaux obtenus avec les souris LPA₁^(-/-) quant au rôle du LPA et du LPA₁ dans l'ostéogenèse et potentiellement la cémentogenèse.

CHAPITRE I

Le Développement du tissu osseux

Le tissu osseux revêt une importance capitale pour l'organisme tant sur le plan biomécanique que métabolique dans le maintien de l'homéostasie.

1- Morphologie du tissu osseux :

1.1-Macroscopiquement :

On distingue macroscopiquement l'os cortical ou compact de l'os trabéculaire ou spongieux. La différence est basée sur le degré de porosité qui est de 5 à 30% pour l'os cortical et de 30 à 90% pour l'os trabéculaire. L'ensemble est entouré d'une enveloppe externe, le périoste, sauf au niveau du cartilage articulaire et aux endroits d'insertion de tendons et de ligaments.

1.2- Microscopiquement :

Il peut être classifié de différentes manières :

- En fonction de la disposition des fibres de collagène:
 - L'os fibreux réticulé (*woven bone*) ou os immature avec des fibres de collagène dispersées sans organisation particulière dans la matrice. C'est un os de faible résistance mécanique que l'os retrouve chez le fœtus ou lors de réparation de fractures.
 - L'os fibreux fasciculé (*bundle bone*) dans lequel les fibres de collagène s'entremêlent avec celles des ligaments et tendons qui s'y attachent comme dans l'os alvéolaire.
 - L'os lamellaire (*lamellar bone*) ou os mature avec des fibres de collagène déposées en lamelles concentriques pour former des ostéones.
- En fonction de son origine embryologique
 - L'os endochondral dont l'élaboration commence par une ébauche cartilagineuse qui se calcifie et sera progressivement remplacée par du tissu osseux. Cette ossification forme de l'os spongieux et intervient au cours de la formation des os longs.
 - L'os membraneux dont l'élaboration se fait directement à partir des tissus mésenchymateux environnants. C'est le cas des os plats.
- En fonction du moment d'apparition du tissu osseux :

- Le tissu osseux primaire qui est un tissu osseux fibreux réticulé formé durant l'embryogenèse. Il est moins résistant que les tissus osseux secondaires et tertiaires.
- Le tissu osseux secondaire ou de renouvellement dans le quel les fibres de collagène sont d'avantage orientées.
- Le tissu osseux tertiaire qui provient du remodelage après la naissance du tissu osseux secondaire et dans lequel apparaît les systèmes haversiens.

2- Composition de l'os :

Le tissu osseux est composé de cellules (ostéoblastes, ostéocytes, ostéoclastes) et d'une matrice extracellulaire.

2.1- La matrice extracellulaire :

Elle occupe entre 92 et 95% du volume tissulaire et peut être subdivisée en matrice organique (22%) et inorganique (69%). La teneur en eau, environ 9%, est très variable en fonction de l'âge et du degré de minéralisation.

- La matrice organique représente 22% de la masse osseuse et forme l'ostéode. Elle est composée à 90% de substance fibrillaire contenant des protéines structurales (collagène, 90% et élastine) ou adhérentes (fibronectine) et de substance interfibrillaire (10%) englobant les glycosaminoglycanes, protéoglycanes, petites protéines non collagéniques (ostéopontine, ostéonectine, ostéocalcine et sialoprotéine osseuse) ainsi que de petites quantités de lipides.
- La matrice inorganique représente 69% de la masse osseuse. Les sels minéraux les plus abondants sont le calcium (27%) et le phosphore (12%).

2.2- Les cellules :

Il existe 4 types principaux de cellules osseuses

- Les cellules ostéoprogénitrices qui dérivent des cellules mésenchymateuses et forment une population de cellules souches qui peuvent se différencier en cellules plus spécialisées (ostéoblastes et ostéocytes) formant l'os.
- Les cellules ostéoblastiques sont des cellules actives cuboïdales, polyédriques ou vésiculeuses, polarisées, dont le noyau est excentré et le cytoplasme rempli d'organites impliqués dans la synthèse et la sécrétion de macromolécules matricielles.

- Les ostéocytes sont des ostéoblastes à l'état de repos présents sur les surfaces osseuses ou emprisonnés dans la matrice qu'ils ont synthétisée ; dans quel cas ils sont logés dans une lacune appelée ostéoplaste.
- Les ostéoclastes sont des cellules géantes plurinucléées dérivant de monocytes sanguins. Ce sont des cellules polarisées qui sécrètent des acides organiques tels que des citrates et des lactates qui assurent la dissolution des minéraux osseux, ainsi que des hydrolases acides qui vont digérer la matrice organique. Cette résorption se fait au niveau de zones appelées lacunes de Howship.

3- Mécanismes de l'ostéogenèse :

Le développement osseux chez l'homme et les mammifères est un processus complexe composé de phases séquentielles de morphogenèse et de croissance. Le squelette embryonnaire est formé dans un premier temps et le squelette adulte dans un second temps.

Deux types d'ossification, membranaire et endochondrale contribuent à son développement (8-10). Le point de départ de ces deux types d'ossification est la condensation à partir de progéniteurs mésenchymateux. Ceux-ci sont à l'origine de la formation du tissu osseux avec trois origines embryologiques différentes : les crêtes neurales, les somites et les plaques latérales du mésoderme (11, 12) (figure 1). Ces progéniteurs communs aux ostéoblastes et chondrocytes sont parfois appelés progéniteurs ostéochondraux (11, 13).

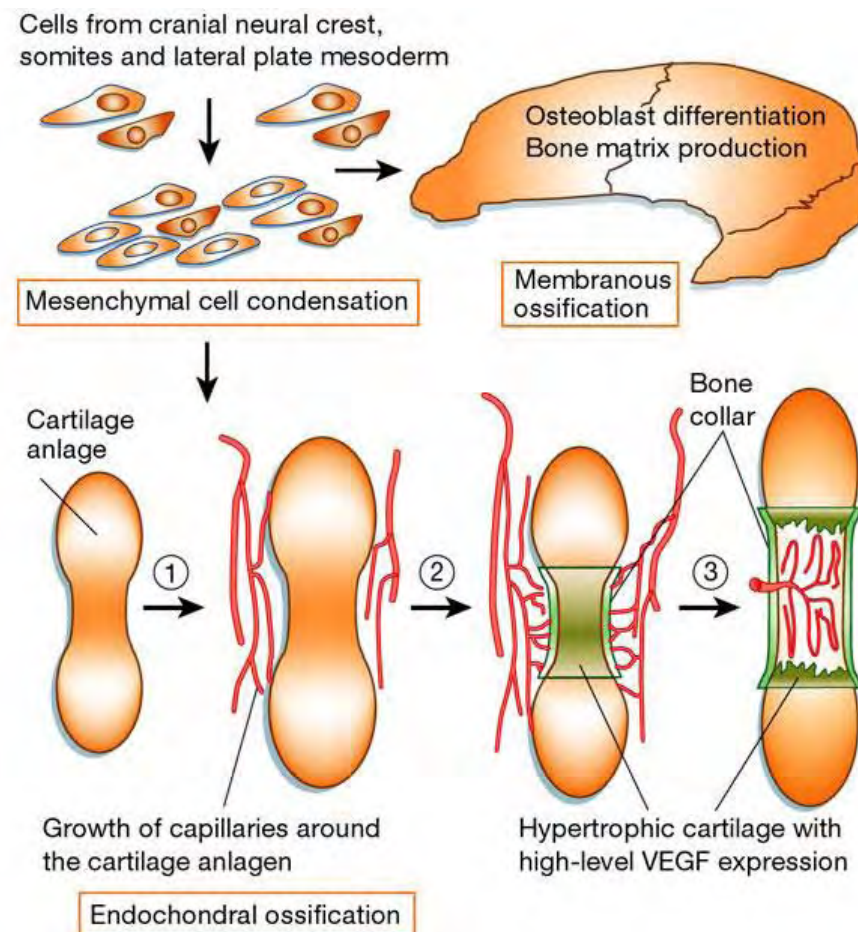


Fig. 1: Développement squelettique. Les cellules des crêtes neurales, les somites et le mésoderme des plaques latérales forment des condensations mésenchymateuses au niveau des sites des futurs os. Dans le cas de l'ossification membranaire, il y a différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes et production de matrice osseuse. Par contre, dans le cas de la différenciation endochondrale, les cellules se différencient en chondrocytes et forment une trame cartilagineuse qui sera ensuite remplacée par de l'os (10).

3.1- Ossification membranaire

Cette ossification concerne les os plats de la calvaria essentiellement ainsi que la partie distale de la clavicule (12, 14). Elle débute par la condensation de tissus mésenchymateux. Les cellules mésenchymateuses vont se différencier directement en ostéoblastes produisant la matrice osseuse. Ensuite l'ossification va progresser de proche en proche à partir du centre et il y a formation d'un réseau de travées osseuses qui donnent un aspect spongieux à l'os. Cet os fibreux sera ensuite totalement résorbé et remplacé par de l'os lamellaire. Le tissu conjonctif qui entoure l'os spongieux se transforme en périoste. Chez l'adulte, sa face profonde élaborera des lamelles osseuses de tissu osseux compact qui formeront les tables externes et internes de l'os.

L'ossification membranaire a été associée avec l'expression de marqueurs de l'ostéogenèse comme des facteurs de transcription pour le collagène de type I (ColI), l'ostéopontine, la *bone sialoprotéine* (BSP), l'ostéocalcine (OC), les BMPs et des cytokines pro-inflammatoires TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*) et l'interleukine (IL)-1 α . Le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) est présent de façon précoce dans l'os membranaire (12).

De manière synthétique, ainsi que résumé dans la figure 2, certains facteurs de transcription sont essentiels pour l'ossification membranaire tels que Runx2 et Sox9. En l'absence de Runx2, le squelette est constitué seulement de cartilage ou de tissu conjonctif membranaire non ossifié (10, 12). Un signal fort de la part de membres de la famille des protéines Wnt, notamment Wnt 4 et Wnt 9a, influence les cellules mésenchymateuses vers la formation de tissu osseux membranaire avec une diminution de l'expression de Sox9 et une augmentation de l'expression de Runx2 (11). Enfin, Ostérix (Osx), un facteur de transcription en aval de Runx2, exprimé dans les ostéoblastes est indispensable à la différenciation ostéoblastique. Les souris déficientes en Osx présentent un arrêt complet de la différenciation ostéoblastique mais pas d'anomalies de la différenciation ou maturation chondrocytaire (10).

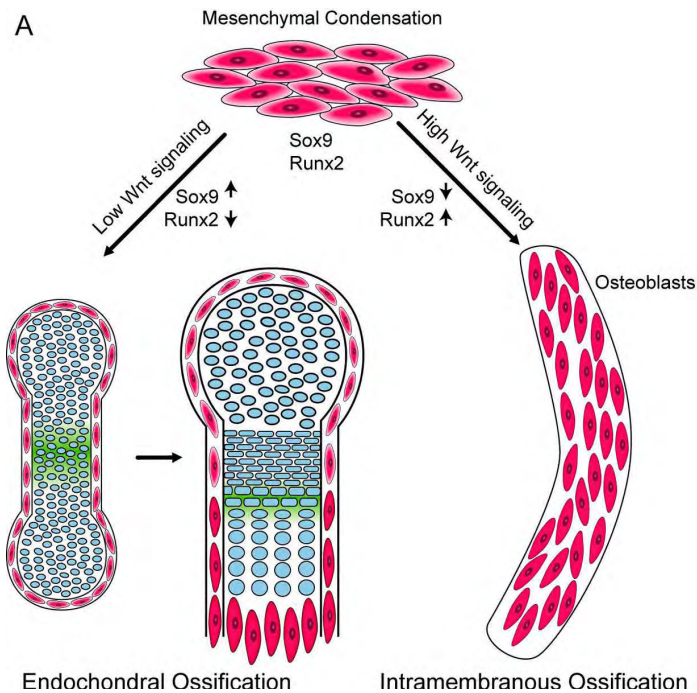


Fig. 2: Différenciation des cellules progénitrices mésenchymateuses par Wnt et Ihh. **A:** Wnt contrôle la différenciation chondrocytaire et ostéoblastique des progéniteurs mésenchymateux au niveau des condensations mésenchymateuses. Un signal Wnt faible oriente les cellules vers la différenciation cartilagineuse (ossification endochondrale) alors qu'un signal fort oriente les cellules vers la différenciation ostéoblastique (ossification membranaire). La signalisation par Ihh est représentée en vert. Ihh est exprimé dans les chondrocytes hypertrophiques et envoie un signal au périoste afin de réguler la différenciation ostéoblastique (11).

3.2- Ossification endochondrale

Le processus d'ossification endochondrale concerne la majorité des os. Il est responsable de la croissance en longueur des os longs mais aussi des vertèbres et des os de la base du crâne. Il repose sur la formation d'une matrice cartilagineuse qui sera remplacée progressivement pendant le développement fœtal et après la naissance par de l'os. Ces matrices cartilagineuses sont issues de la condensation de cellules mésenchymateuses qui se différencieront ensuite en chondrocytes et sécrèteront les composants de la matrice extracellulaire du cartilage (15).

L'ossification endochondrale comporte deux phases : la première est la destruction du cartilage initial, la seconde son remplacement par de l'os. Le cartilage initial est envahi dans son centre puis à chaque extrémité de l'os par des cellules qui vont constituer des centres d'ossification primaire et secondaire. Ces centres d'ossification s'étendent progressivement au reste du cartilage et finissent par le remplacer complètement sauf au niveau des surfaces articulaires (12, 14, 15) (figure 3).

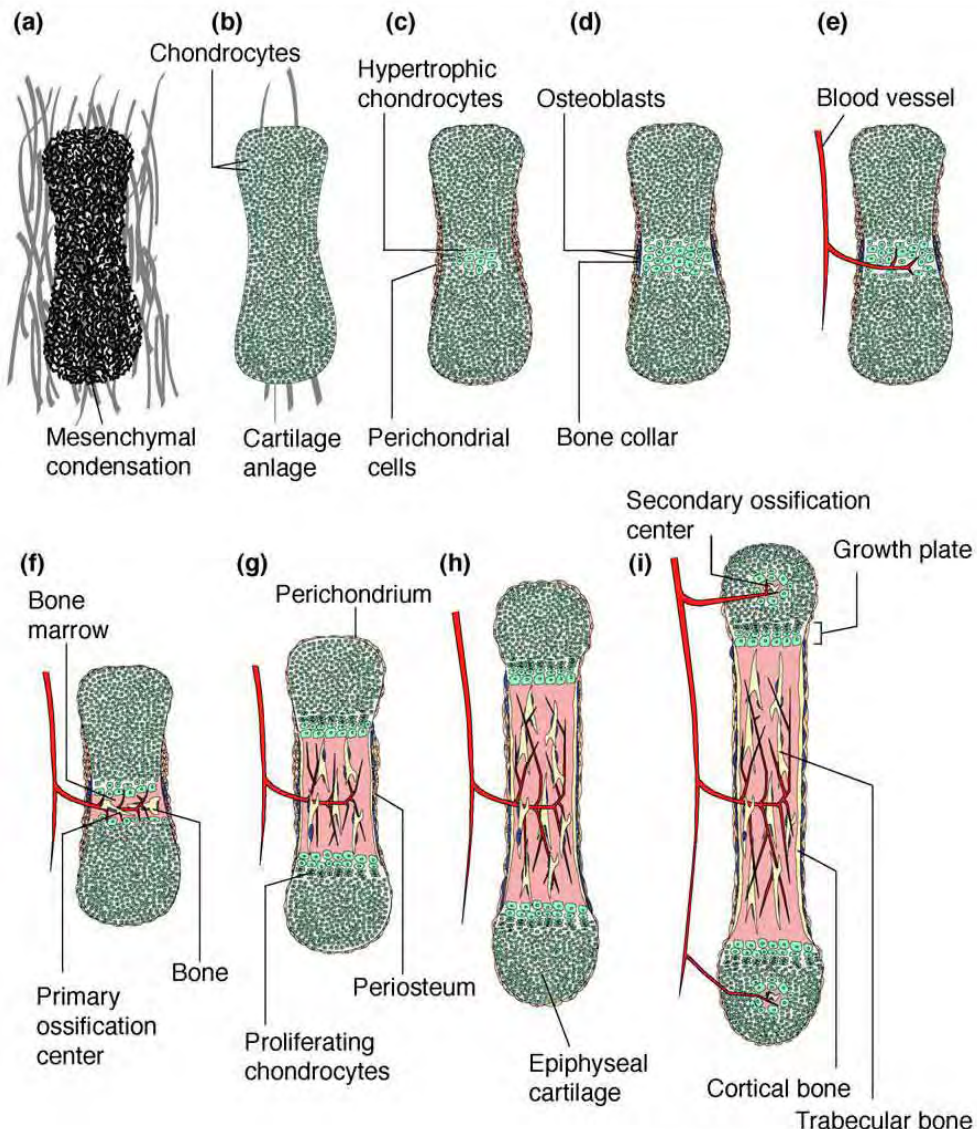


Fig. 3 : Développement osseux endochondral de la phase de condensation mésenchymateuse à la phase mature de la plaque de croissance. **(a, b)** les chondrocytes se différencient au sein des condensations mésenchymateuses afin de former la trame cartilagineuse des futurs os. **(c, d)** coïncidant avec l'apparition du *bone collar* dans la partie centrale, il y a hypertrophie chondrocytaire dans la partie centrale suivi par une invasion de cellules vasculaires et ostéoblastiques au niveau du bone collar **(e)** formation des centres d'ossification primaire **(f)** ; extension du processus vers l'extrémité des os formant éventuellement des plaques de croissance matures **(h)** ; les centres d'ossification secondaire se forment ensuite dans le cartilage des épiphyses **(i)** (8).

Au niveau de ces centres d'ossification va se mettre en place une structure de différenciation organisée en colonnes dans laquelle les chondrocytes prolifèrent puis s'hypertrophient et involuent par apoptose. A ce stade, la matrice cartilagineuse est envahie par un réseau vasculaire progressivement remplacé par le front d'ossification (8) (figure 4).

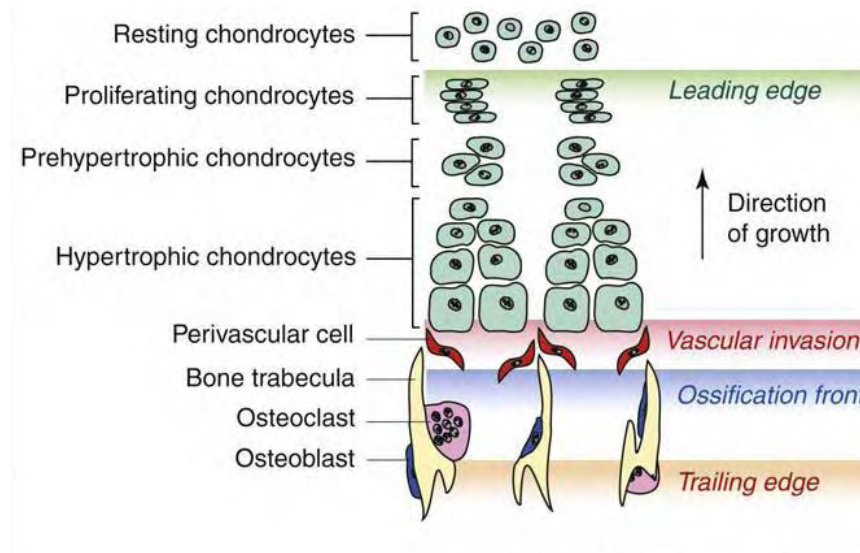


Fig. 4: Structure de la plaque de croissance . La plaque de croissance est une structure dynamique avec une zone de prolifération chondrocytaire (**vert**) et une zone où le cartilage formé les chondrocytes prolifératifs et différenciés (**marron**) est dégradé et envahi par le réseau vasculaire (**rouge**) et remplacé par le front d'ossification (**bleu**) (8).

L'apoptose des chondrocytes hypertrophiques conduit à leur remplacement par des progéniteurs ostéoblastiques et à l'élaboration de tissu osseux trabéculaire au sein d'une matrice osseuse progressivement calcifiée. Le chondrocyte hypertrophique, organisateur de l'ossification endochondrale, envoie lors de son apoptose des signaux aux cellules du front d'ossification en produisant divers facteurs de croissance. La production de VEGF par les chondrocytes hypertrophiques contribue notamment à l'envahissement vasculaire de cette zone, à l'activité chondroclastique et au recrutement de progéniteurs ostéoblastiques du *bone collar* (15-17).

La différenciation chondrocytaire est le véritable moteur de l'ossification endochondrale et de ce fait, de la croissance des os longs (figure 4). Nous reviendrons plus loin sur les facteurs influençant la dynamique de la plaque de croissance.

3.3- Régulation de l'ossification endochondrale

3.3.1- Progéniteurs mésenchymateux et plaque de croissance

Aujourd'hui, la nature des progéniteurs mésenchymateux aux propriétés de différenciation multiple est mieux connue. Après le développement embryonnaire, il persiste des niches de cellules souches où les progéniteurs cellulaires sont maintenus dans un état quiescent indifférencié et servent au renouvellement des tissus (18). Ces sites sont très variés, incluant notamment la moelle osseuse, le follicule dentaire qui sera évoqué plus loin (2), ou le stroma du tissu adipeux.

Deux types de progéniteurs sont impliqués dans l'ossification endochondrale.

La chondrogénèse, qui permet le renouvellement cellulaire au niveau de la plaque de croissance et conditionne sa dynamique, repose sur les progéniteurs indifférenciés présents au niveau de la zone de réserve. Les acteurs les mieux connus de la différenciation chondrogénique à partir de ces progéniteurs sont les BMPs, les membres de la famille des *Transforming growth factors* β (TGF β), les FGF (*Fibroblast Growth Factor*) mais aussi GH (*Growth Hormone*) et l'IGF1 (*Insulin-like Growth Factor1*). Ces facteurs peuvent servir à l'orientation des progéniteurs *ex vivo*. En particulier, les BMPs et les FGFs inhibent l'expression d'Ihh et favorisent le passage au stade du chondrocyte hypertrophique.

Ces progéniteurs ouvrent des perspectives en termes de thérapie génique ou cellulaire, au moyen de facteurs chondrogéniques administrés *in situ* ou par le biais de chondrocytes modifiés génétiquement et transplantés (19). Des résultats ont déjà été obtenus lors d'administration systémique de progéniteurs dans les troubles sévères de l'ostéogenèse (20, 21). Ces expériences tendent à mimer une des propriétés fondamentales de l'ossification endochondrale qu'est le mécanisme de réparation des fractures des os longs et en partage vraisemblablement le conditionnement génétique (22).

3.3.2- Facteurs impliqués dans la régulation de l'ossification endochondrale (figure5)

De manière schématique, nous aborderons quatre points:

- celui impliquant Ihh, PTHrP et l'AMPc
- celui impliquant le FGFR3 et le GMPc
- celui impliquant les BMPs
- les facteurs de transcription

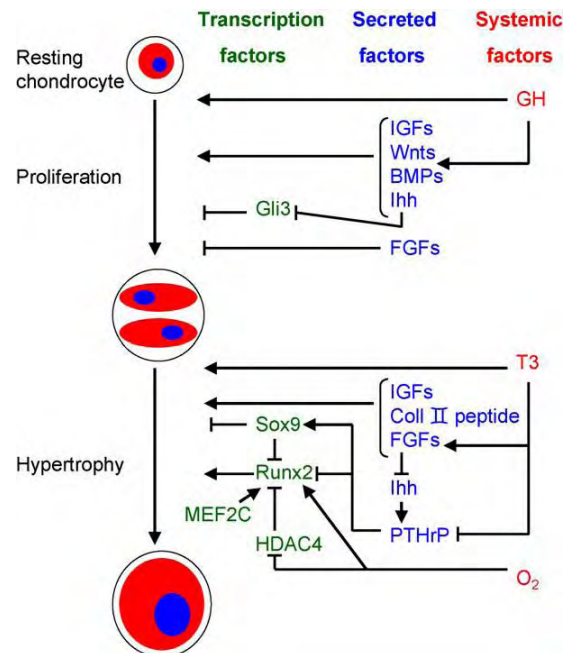


Fig. 5: Représentation schématique du rôle des facteurs systémiques (**rouge**), localement sécrétés (**bleu**) et de transcription (**vert**) impliqués dans la régulation de la prolifération et de l'hypertrophie des chondrocytes au cours de l'ossification endochondrale, d'après Mackie *et al.*, 2008 . Les flèches indiquent les voies activatrices et les lignes barrées les voies inhibitrices (15).

3.3.2.1- Ihh, PTHrP et l'AMPc

Ihh (*Indian hedgehog*) est un facteur qui coordonne la prolifération des chondrocytes et la différenciation des chondrocytes et des ostéoblastes. Ihh est synthétisé par les chondrocytes qui quittent le stade prolifératif, aux premiers stades de l'hypertrophie. Il lie un récepteur membranaire *Patched-1* (Ptc-1) qui active *Smoothened* (Smo) une protéine membranaire entraînant une cascade d'activation de gènes. Le défaut d'Ihh ou de Smo entraîne un défaut de prolifération chondrocytaire et une augmentation de la fraction hypertrophique, les chondrocytes quittant prématurément le pool prolifératif. Il est établi que ceci est dû à un déficit de synthèse du PTHrP (*Parathyroid Hormone-related Peptide*), une protéine synthétisée par les cellules du péri-chondre et par les chondrocytes prolifératifs. Cette

interaction Ihh/PTHrP définit donc un système paracrine qui contrôle donc la décision des chondrocytes de quitter le pool prolifératif (23). Le PTHrP sécrété à l'extrémité de l'os agit par son récepteur PTHR1 (*Parathyroid Hormone-related Peptide Receptor 1*) pour maintenir les chondrocytes en prolifération et maintenir les chondrocytes dans le pool prolifératif. Le défaut ou l'excès de PTHrP ou de PTHR1 dans différents modèles génétiques modifie cette zone proliférative. Lorsque la concentration de PTHrP diminue avec la progression directionnelle des chondrocytes dans la plaque de croissance, ceux-ci cessent de proliférer et entrent en différenciation terminale. Ils synthétisent alors Ihh qui va stimuler la production de PTHrP à l'extrémité de l'os. L'interaction Ihh/PTHrP détermine donc la distance entre la zone de réserve et le début de l'hypertrophie. Ce système paracrine est ajusté pour permettre l'organisation fonctionnelle cohérente du cartilage de croissance (figure 5) (15, 23).

Un autre effet d'Ihh réside dans la différenciation des ostéoblastes. En effet, le défaut d'Ihh annule leur production au front d'ossification et au niveau du bone collar. Il s'agit d'un effet direct par le biais de Ptc-1, exprimé par les cellules du péri-chondre et par l'induction du facteur de différenciation ostéoblastique Runx2. Cette propriété d'induction ostéoblastique par Ihh est spécifique de l'ossification endochondrale (figure 2) (11).

Le récepteur PTHR1 est couplé à plusieurs voies de signalisation intracellulaires liées aux protéines G hétérotrimériques. La signalisation cellulaire en aval du PTHR1 dépend en grande partie de l'AMP cyclique (AMPC). Expérimentalement, les souris invalidées pour le PTHrP ou le PTHR1 montrent une hypertrophie chondrocytaire accélérée (24). A l'inverse l'expression excessive du PTHR1 ou du PTHrP provoque une hypertrophie chondrocytaire différée (25-28).

En l'absence de PTHrP la constitution des zones proliférative et hypertrophique est altérée, avec des cellules qui à la fois prolifèrent et deviennent hypertrophiques. Les mutations activatrices du récepteur PTHR1 sont observées dans la dysplasie de Jansen responsable de retard statural, et les mutations inactivatrices dans la forme plus sévère de Blomstrand (29).

La sous-unité $G_{s\alpha}$ elle-même, codée par le gène GNAS, peut faire l'objet de mutations. Des mutations inactivatrices sont responsables de pseudohypoparathyroïdie de type IA, qui comporte une maturation osseuse accélérée responsable de l'ostéodystrophie d'Albright. Une partie des effets du PTHR1 et $G_{s\alpha}$ par le biais de la PKA (Protéine Kinase A) dépendent du facteur de transcription Runx2, impliqué dans la différenciation du chondrocyte (25). Ce facteur est aussi impliqué dans la différenciation ostéoblastique. Les mutations somatiques activatrices de GNAS, qui peuvent exister au niveau des lésions de dysplasie osseuses, par exemple dans le cas de syndromes de Mac Cune Albright, sont responsables

d'un blocage de la différenciation ostéoblastique (30). Ceci peut être partiellement restauré par la surexpression de Runx2 (31).

Les signaux de type G_i peuvent influencer négativement le taux d'AMPc. Leur effet propre sur le cartilage de croissance est encore peu documenté. Plusieurs agonistes de la voie G_i ont une influence sur l'ossification endochondrale: c'est le cas de la mélatonine ou de la sérotonine (32, 33). Il est probable qu'une régulation fine du tonus d'AMPc soit nécessaire pour un contrôle idéal de la différenciation ostéoblastique et chondrocytaire au niveau du cartilage de croissance.

3.3.2.2- FGFR3 et GMPc

Les *Fibroblast Growth Factors* (FGF) et leurs récepteurs (FRFR) sont des familles de protéines homologues essentiels dans le développement. Les FGFR possèdent un domaine extra-cellulaire de liaison des FGF et un domaine tyrosine kinase intracellulaire dont la signalisation est multiple. L'expression de ces récepteurs impliqués dans le développement diffère suivant le stade et selon les tissus. Plusieurs récepteurs des FGFs sont exprimés au niveau du cartilage de croissance (figure 5) et sont impliqués dans des dysplasies squelettiques de sévérité variable. Les FGFR3 et FGFR1 sont exprimés par le chondrocyte pré-hypertrophique, les cellules du périchondre expriment le FGFR1. Certaines mutations activatrices du gène du FGFR3 sont responsables d'achondroplasies ou de syndromes apparentés dont la sévérité est liée à l'impact fonctionnel de la mutation (34). Chez l'animal de telles mutations diminuent la prolifération chondrocytaire et désorganisent la structure du cartilage de croissance, qui est de taille réduite.

Le FGFR3, dont une partie des effets dépend de l'expression diminuée d'Ihh (17), inhibe la prolifération et la différenciation terminale ainsi que la synthèse de matrice post mitotique des chondrocytes par le biais des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) (35). Ces signaux intracellulaires sont modulés par le GMP cyclique (GMPc), identifié comme un régulateur majeur de l'ossification endochondrale (36), dont la production dépend des peptides natriurétiques, en particulier du CNP (*C-type natriuretic peptide*) et de son récepteur NPR-B. L'inactivation du gène codant pour NPR-B est responsable de dysplasie acromésomélique de type Maroteaux et de nanisme chez la souris.

A l'inverse l'inactivation du récepteur NPR-B qui assure la clairance des peptides natriurétiques entraîne une croissance exagérée. Le NPR-B paraît lier l'ostéocrine, une protéine produite par les ostéoblastes du front d'ossification. La surexpression de l'ostéocrine augmente le taux de GMPc avec un accroissement de la croissance des os longs (37, 38). CNP

et NPR-B sont exprimés par les chondrocytes de la zone proliférative et pré-hypertrophique, suggérant une boucle de régulation paracrine permettant d'ajuster la dynamique du cartilage de croissance.

L'activité MAPK et GMPc est un élément de contrôle de la dynamique de la plaque de croissance. La surexpression du CNP restaure le phénotype de souris achondroplases en inhibant les MAPK (39) (figure 6).

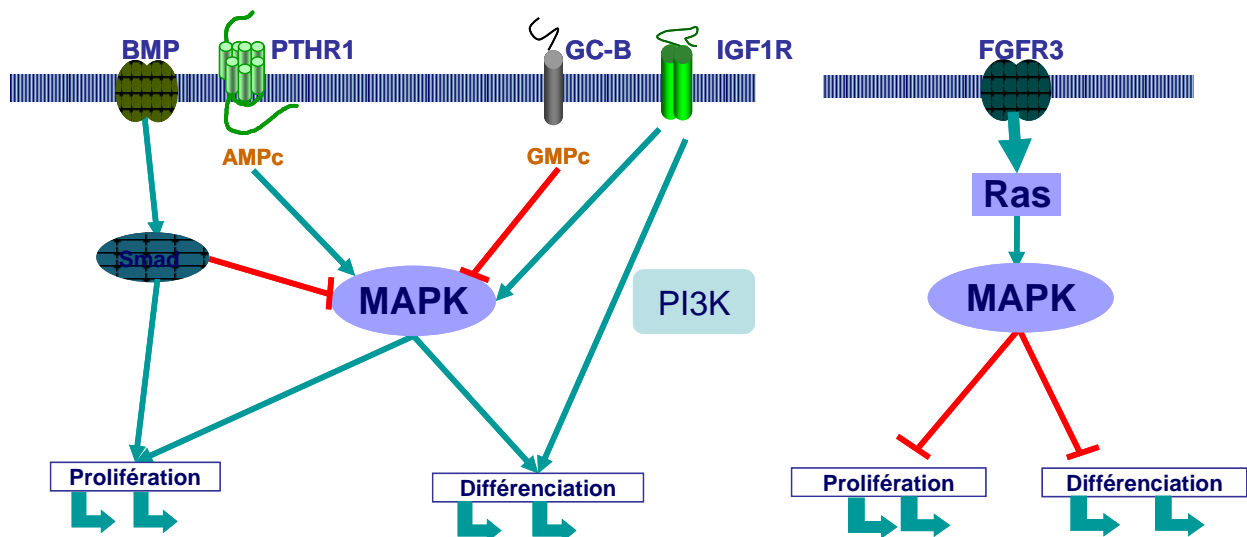


Fig. 6 : Contrôle cellulaire de la prolifération et de la différenciation chondrocytaire de la plaque de croissance. Les MAPK sont un élément fondamental de la signalisation, activées par l'AMPc et le PTHR1 couplé à une protéine Gs, par l'IGF1R et le FGFR3. Elles sont inhibées par le GMPc produit par le récepteur GC-B. L'activité MAPK permet, à son niveau normal, la prolifération. La différenciation paraît stimulée par la voie PI3K et l'IGF1R. (**flèches vertes** : activatrices ; **flèches rouges** : inhibitrices). La dysrégulation de l'activité MAPK, excessive dans l'achondroplasie, empêche la différenciation.

3.3.2.3- Les Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Les *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) découvertes en 1965 par Urist (40), appartenant à la famille des TGF β , sont largement impliquées en biologie du développement, cancérologie et ingénierie tissulaire. Leurs rôles dans le développement des structures cranio-faciales, la différenciation des cellules souches mésenchymateuses ainsi que leur potentiel ostéoinducteur ont permis de jeter les bases biologiques de la régénération tissulaire (41, 42).

L'activité biologique des BMP passe par leur liaison à des récepteurs membranaires de type sérine-thréonine kinase de type I et II qui par dimérisation vont à leur tour phosphoryler des protéines intracellulaires appelées Smad (apparentés aux protéines SMA (*small body size*) et MAD (*mother against dpp*)). Une fois les Smad 1, 5, 8 phosphorylées dits R-Smad celles-ci

vont interagir avec la Smad4 ou Co-Smad (*Common-mediator Smad*) et ce complexe va être transféré au noyau où il va jouer le rôle de facteur de transcription et entraîner l'expression de gènes cibles comme des facteurs de croissance tels que Shh et les BMPs elles-mêmes, des protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène de type 1, la phosphatase alcaline, l'ostéopontine ou la sialoprotéine osseuse qui sont impliqués dans la biologie des tissus calcifiés (43-46).

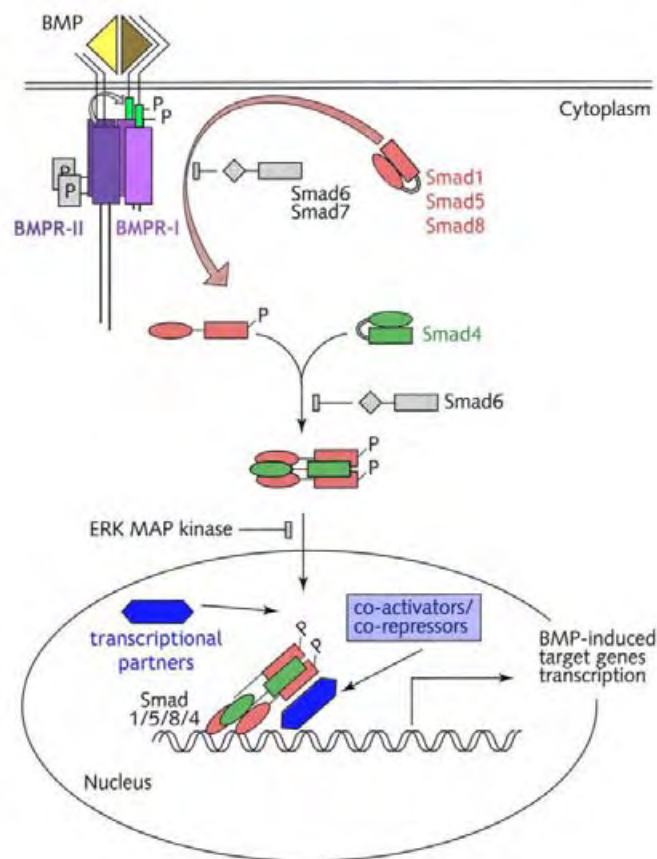


Fig. 7: Voie de signalisation des BMPs Smad dépendante. Les dimères de BMP-2, -4 ou-7 (**jaune**) se lient au complexe de récepteur (de type I et II) (**violet**) entraînant la phosphorylation du récepteur de type I (BMPR-I) par le récepteur de type II (BMPR-II) qui en retour va conduire à la phosphorylation d'une R-Smad (Smad 1, 5 ou 8) (**rouge**). Cette Smad phosphorylée se lie à la Co-smad (Smad 4) (**verte**) et se complexe R-/Co-Smad pénètre le noyau cellulaire pour activer ou réprimer des gènes cibles en fonction des cofacteurs (**bleu**) présents (47).

Elles peuvent aussi activer d'autres voies de signalisation Smad indépendante comme la voie Ras/MAPK. L'activation de cette voie dans les ostéoblastes humains conduit à la régulation spécifique de BMP-2 (figure 8) (43).

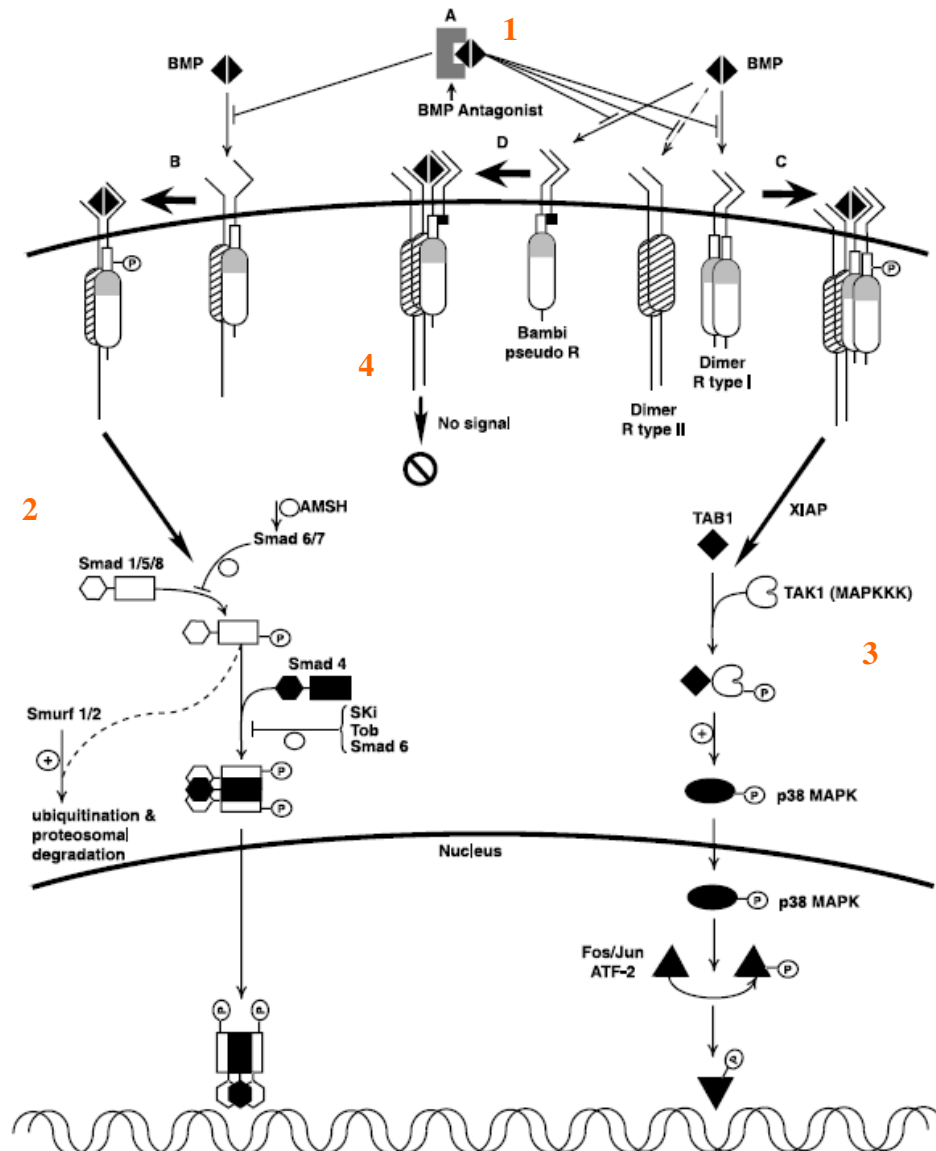


Fig. 8: Les différentes voies en aval des BMPRs. Le mécanisme d'activation cellulaire par les BMP possède plusieurs niveaux de régulation. **1)** sécrétion extracellulaire d'antagonistes qui se lient aux BMP empêchant leur liaison au récepteur. **2)** la liaison au complexe de récepteur I et II qui entraîne l'activation de la voie Smad dépendante qui peut être inhibé par les Smad 6 et 7 ou ubiquitinylée et dégradée par Smurf 1 et 2 avant la liaison R-Smad/Co-Smad ou par les protéines Ski et Tob après liaison R-/Co-Smad. **3)** la liaison au complexe de récepteur I et II qui entraîne l'activation de la voie p38 MAPK. **4)** liaison à des pseudo-récepteurs aux BMP (BAMBI) n'entraînant pas de signalisation intracellulaire (43).

Les BMP-2, -4 et -7 régulent l'architecture des membres au sein des condensations mésenchymateuses en fonction de l'expression temporo-spatiale des récepteurs aux BMPs, les BMPR-Ia et BMPR-Ib et des antagonistes aux BMP comme Noggin et Chordin (48). Les BMP-2,-3, -4,- 5 et -7 sont exprimées au niveau du périchondre, la BMP-7 par les chondrocytes prolifératifs et les BMP-2 et -6 par les chondrocytes hypertrophiques (49-54).

Les BMP stimulent l'expression d'Ihh et favorisent la prolifération chondrocytaire. Globalement, la signalisation liée aux BMP s'oppose à celle induite par le FGFR3 (17).

Une autre protéine morphogénétique dérivée du cartilage (CDMP-5) et les protéines de la voie Wnt stimulée par les TGF β ont aussi un rôle important dans la chondrogénèse (55-57). Les TGF favorisent la différenciation chondrogénique. .

Des études récentes ont montré que l'activation des BMPR de type I entraînaient la surexpression de gènes cibles tels que le récepteur LPA₁ offrant de nouvelles perspectives sur la relation entre les BMPs et le LPA dans l'ostéogénèse (58). Une autre mise en évidence d'une potentielle relation entre les BMP et la production de LPA pendant l'ostéo-chondrogenèse et le développement dentaire proviendrait du fait que la BMP-2 entraînerait la transcription de l'ARNm de l'autotaxine lors de la différenciation cellulaire ostéo-chondrocytaire (59).

3.3.2.4- Les facteurs de transcription

La différenciation des chondrocytes et ostéoblastes connaît une étape commune dite ostéo-chondrocytaire, puis une différenciation des deux lignées conditionnée par l'expression de facteurs de transcription spécifiques (60).

La différenciation chondrocytaire initiale à partir des précurseurs mésenchymateux est sous la dépendance du gène Sox9, codant pour un facteur de transcription dont les mutations sont responsables en pathologie de dysplasie campomélique, qui comporte des os courts et incurvés. La plaque de croissance y est de taille réduite avec une expansion de la zone hypertrophique et une minéralisation prématurée (61, 62). Sox9 est en fait impliqué dans le passage de la cellule mésenchymateuse indifférenciée à un progéniteur ostéo-chondrocytaire. Le déficit total de Sox9 empêche les condensations mésenchymateuses (17). Sa délétion à des stades plus tardifs, diminue la prolifération des chondrocytes et l'expression des gènes responsables de l'élaboration de la matrice et de la signalisation Ihh/PTHrP. Les chondrocytes passent alors prématurément au stade hypertrophique. Les phénotypes de délétion de Sox9 sont proches de ceux de déficit dans d'autres membres de la famille Sox notamment Sox5 et

6, qui coopèrent avec Sox9 et dont la synthèse dépend de Sox9. Ceci identifie Sox9 comme un gène essentiel de la chondrogénèse (10).

Le facteur de transcription Runx2, indispensable à la différenciation ostéoblastique, est également important pour la différenciation terminale des chondrocytes du cartilage de croissance (63). L'haplo-insuffisance de Runx2 lors de mutations hétérozygotes est responsable de dysplasie cleido-crânienne avec pour phénotype le défaut de formation des os médians tels que les clavicules (10, 64, 65). Runx2 est exprimé à un stade tardif dans les condensations mésenchymateuses. Il est peu exprimé dans les chondrocytes prolifératifs et réapparaît au stade pré-hypertrophique. Il est aussi fortement exprimé au niveau du périchondre et par les ostéoblastes en différenciation. Les souris déficientes en Runx2 ont un nombre diminué de chondrocytes hypertrophiques et un défaut de minéralisation avec des cartilages de croissance anormaux (66). Dans la différenciation ostéoblastique, et probablement également au niveau chondrocytaire ainsi que discuté plus haut, l'expression de Runx2 est sous la dépendance de l'AMPc. Un excès de Runx2 serait responsable d'un blocage de la différenciation, et pourrait être restauré par la normalisation du taux d'AMPc (31) (figures 2 et 9).

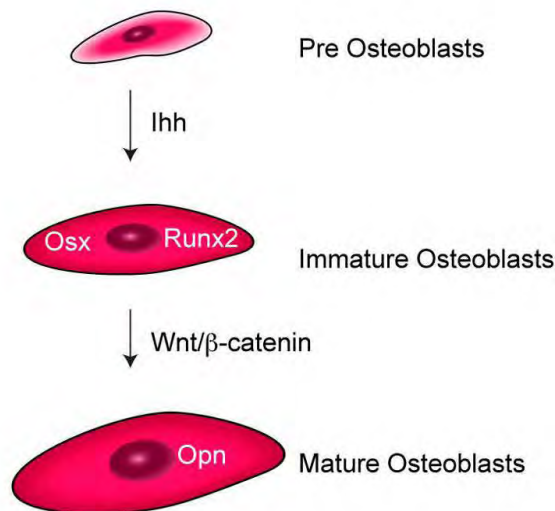


Fig. 9: Wnt et Ihh dans la différenciation ostéoblastique des cellules ostéochondrales. Ihh est indispensable à la différenciation des progéniteurs ostéochondraux et entraîne l'expression de Runx2 qui à son tour contrôle l'expression d'Osx. Ensuite Wnt est requis pour la maturation ostéoblastique. Osx = Ostérix, and Opn = Ostéopontine (11).

3.4- Dynamique du cartilage de croissance

L'ossification endochondrale résulte donc d'une interaction complexe entre facteurs de croissance locaux et systémiques, et l'activation de processus de différenciation impliquant de nombreux facteurs de croissance et de transcription, actifs sur la différenciation de progéniteurs à la fois chondrocytaires et ostéoblastiques.

Le niveau d'activité du cartilage de croissance et sa persistance jusqu'à la fin de la puberté sont les deux éléments qui conditionnent la croissance. Ces deux phénomènes vont être amplifiés durant la période pubertaire lors du pic de croissance dont l'amplitude et la durée sont variables. Ces deux données sont sous-tendues en premier lieu par la dynamique du cartilage de croissance: la rapidité du renouvellement des chondrocytes de la zone proliférative à partir des cellules progénitrices et leur différenciation ultérieure en chondrocytes hypertrophiques. Une activité restreinte de la zone proliférative, un décalage de l'entrée en différenciation vont, comme dans l'achondroplasie, modifier le potentiel de croissance. Cette activité va persister à un niveau relativement génétiquement déterminé durant toute la période de croissance. L'activité proliférative des progéniteurs pourra se modifier en fonction du contexte environnemental et hormonal, par exemple dans les cas de rattrapage statural.

La croissance va s'arrêter à un stade génétiquement déterminé, la métaphyse fusionnant avec l'épiphyse avec disparition du cartilage de croissance. L'interprétation habituelle de ce phénomène est que la croissance s'arrête parce que l'épiphyse fusionne. En fait, cette notion a été reconsidérée par A.M. Parfitt (67), qui souligne que le mécanisme de l'arrêt de la croissance est la diminution de l'activité du cartilage de croissance. La plaque de croissance diminue parce que le niveau de prolifération chondroblastique diminue et la fusion épiphysaire succède à l'arrêt de la croissance plutôt qu'elle ne la précède. De même chez le rat la prolifération et la croissance longitudinale cessent 3 semaines avant la fusion épiphysaire. Lorsque la croissance se ralentit, du fait du ralentissement de l'activité chondroblastique, une plaque osseuse se forme du côté épiphysaire, et secondairement, de manière identique du côté métaphysaire. De nouvelles travées se connectent alors parallèlement à la plaque de croissance. Ces structures sont identiques à celles qui se forment lors d'arrêts temporaires de la croissance, sous l'aspect radiologique des lignes de Harris ou de Park. Le cartilage résiduel se trouve alors entre deux épaisseurs d'os qui recrutent des ostéoclastes. Il est complètement résorbé avec une continuité osseuse qui s'établit entre le tissu osseux épiphysaire et métaphysaire. Il persiste radiologiquement quelques années. Cet effet de promotion de la fusion relativement unique dans l'organisme pourrait reposer sur un

mécanisme de sénescence réplivative, dans lequel il se produit une dissociation entre le degré de prolifération et la durée de vie de la cellule. Ainsi que mentionné plus haut, il n'est pas clair si le nombre des cellules progénitrices de la zone de réserve est limitant. Plus probablement la sénescence réplivative est un phénomène actif qui dépend de l'environnement hormonal, en particulier de l'effet complexe des estrogènes, qui à forte dose favorisent sans doute cette sénescence réplivative. Dans les cas d'hyperandrogénie, il pourrait conduire à une fusion prématurée avec pour corollaire un pic de croissance réduit.

La possibilité de traiter les phases actives de la croissance, notamment la période pubertaire, en évitant une évolution prématurée vers la sénescence réplivative, telle qu'observée dans la Pseudoparathyroïdisme ou l'hyperandrogénie, est un problème clinique important. En intervenant sur les mécanismes moléculaires gouvernant la prolifération et la différenciation chondroblastique, par exemple les MAPK, il serait possible d'agir sur le moteur de la croissance sans accélérer la fusion épiphysaire. Toutefois la progression pubertaire, sous l'effet des faibles concentrations d'œstrogènes, est un amplificateur important de la croissance, qui est en grande partie le support de l'effet des traitements actuels, tels que GH ou l'IGF1.

4- Le remodelage osseux :

Au-delà de sa mise en place initiale lors de l'ostéogenèse décrite plus haut, le tissu osseux va subir un remaniement permanent, en grande partie déterminé par la stimulation mécanique. La mise en jeu de ce remodelage est à présent mieux connue sur le plan biologique.

Le remodelage osseux concerne à la fois l'os cortical et membranaire. Ce phénomène existe chez l'adulte et chez l'enfant où il a lieu parallèlement au modelage osseux. Ce remaniement se déroule au sein d'unités fonctionnelles de remodelage. Chez l'adulte sain, 3 à 4 millions d'unités fonctionnelles de remodelage naissent chaque année et environ 1 million assurent le renouvellement osseux à différents endroits du squelette selon une séquence d'événements cellulaires coordonnés dans le temps où ostéoblastes et ostéoclastes sont associés. Ce cycle de remodelage dure chez l'adulte environ 4 mois et comprend une phase de résorption et une plus longue de formation (figure 10).

Le remodelage repose sur une phase initiale de résorption qui dépend de l'activation des ostéoclastes. Le signal déclenchant l'activation des ostéoclastes dépend en fait de la production de RANK-L (*Receptor Activator of Nuclear Factor κ B- Ligand*) par les ostéoblastes.

La seconde phase, d'ostéoformation, repose sur la différenciation de progéniteurs ostéoblastiques dont les mécanismes sont superposables à ceux décrits plus haut.

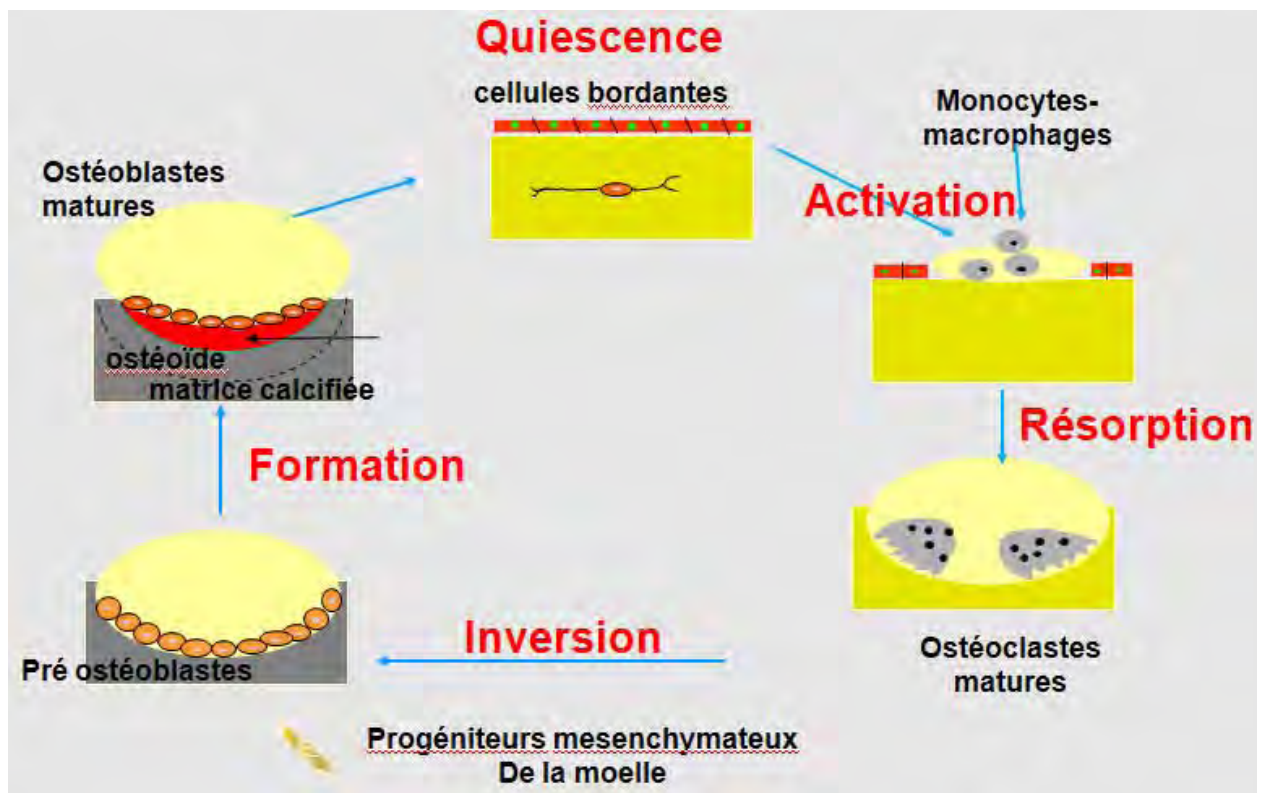


Fig. 10: Les différentes phases du remodelage osseux

4.1- Phase de résorption :

La surface osseuse est recouverte d'ostéoblastes au repos appelés cellules bordantes qui empêchent l'accès des ostéoclastes à la matrice extracellulaire. Durant la phase d'activation, sous l'action de facteurs ostéorésorbants, ces cellules vont se rétracter et libérer l'accès aux ostéoclastes qui dérivent de la lignée des monocytes-macrophages. La différenciation ostéoclastique nécessite surtout la présence d'ostéoblastes et ce programme de différenciation est principalement sous la dépendance de 3 molécules : RANK (*Receptor Activator of Nuclear Factor κ B*), RANK-L (RANK-Ligand), et OPG (Ostéoprotégérine) (figure 11). Les précurseurs ostéoclastiques mononucléés expriment à leur surface RANK. Celui-ci est capable de lier RANK-L qui se trouve à la surface des ostéoblastes ou cellules stromales médullaires. Cette interaction est nécessaire et suffisante avec le M-CSF (*Macrophage-Colony Stimulating Factor*) pour permettre la différenciation ostéoclastique. L'OPG est, elle, synthétisée et sécrétée par les ostéoblastes et exerce un puissant effet inhibiteur sur la différenciation ostéoclastique et la résorption osseuse par sa capacité à se

fixer sur RANK-L. Les facteurs hormonaux ou locaux susceptibles de favoriser la résorption osseuse ostéoclastique sont essentiellement la PTH, PTHrP, IL-1, IL-6, TNF α , le calcitriol, la prolactine, les corticostéroïdes, l'oncostatine M et le LIF. D'autres facteurs comme la calcitonine, les oestrogènes, les BMP-2 et -4, IL-17, le PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), le TGF- β , l'IFN- γ et le calcium ont plutôt une action inhibitrice sur la résorption osseuse (12).

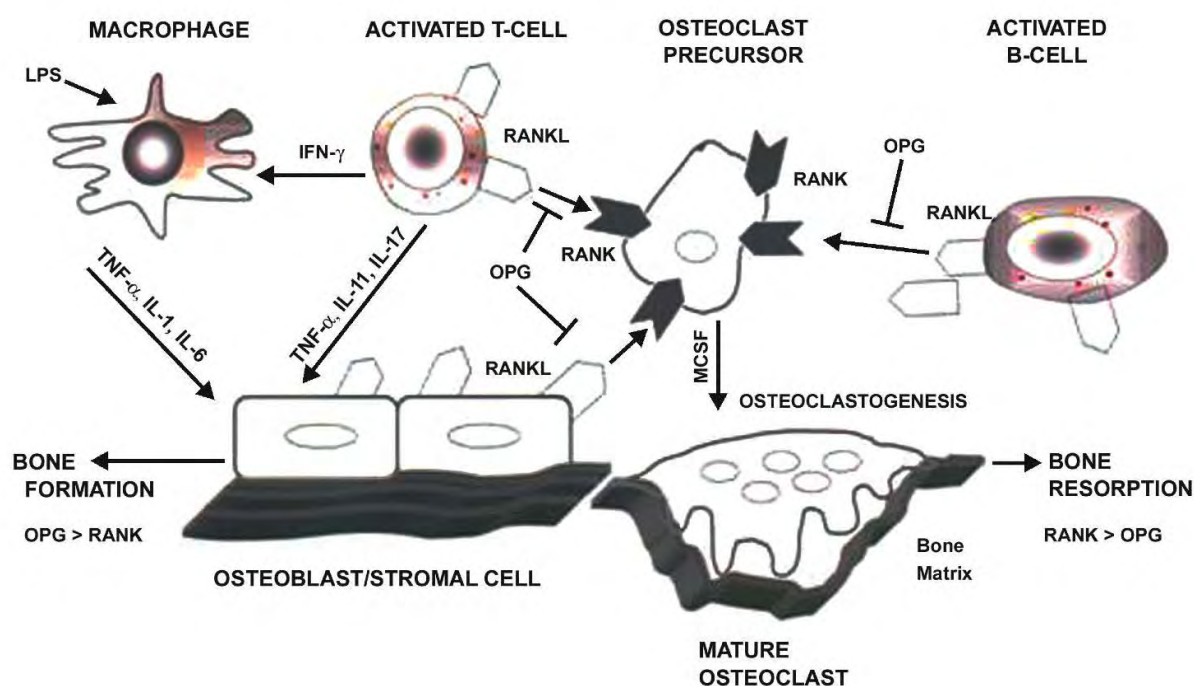


Fig. 11: Action de RANK, RANK-L et OPG dans la résorption osseuse. RANK-L lie RANK exprimé par les progéniteurs hématopoïétiques des ostéoclastes (précurseurs ostéoclastiques) et active une voie de signalisation entraînant l'ostéoclasie. OPG produit par les ostéoblastes est un récepteur leurre de RANK-L et inhibe l'activation ostéoclastique et l'ostéoclasie en se liant à RANK-L. De la même façon, les lymphocytes T peuvent produire des cytokines comme TNF- α , IL-11 et IL-17 qui entraîne l'expression de RANK-L sur les ostéoblastes. Les macrophages activés activent les lymphocytes T qui expriment et produisent RANK-L induisant de façon directe la formation d'ostéoclastes et leur activation. Les lymphocytes B sont aussi capables d'exprimer des formes solubles ou liées de RANK-L. OPG bloque toutes les voies (68).

A la fin de la différenciation ostéoclastique, la cellule est capable de se déplacer à la surface des travées osseuses d'un site de résorption à un autre. L'ostéoclaste a acquis certains caractères phénotypiques caractéristiques tels que l'intégrine $\alpha\beta_3$, des récepteurs à la calcitonine et possède une activité TRAP (*Tartrate Resistant Acide Phosphatase*). L'activité enzymatique TRAP est un bon reflet du nombre et de l'activité des ostéoclastes (69).

L'ostéoclaste activé va se fixer à la matrice sur le site de résorption puis se développer et se polariser. La phase de résorption dure environ 12 jours chez l'homme et débute par une étape de dissolution de la phase minérale par acidification de la chambre de digestion et dégradation de la matrice organique sous l'action d'enzymes protéolytiques lysosomiales telles que la phosphatase acide, la cathepsine, les collagénases, les métalloprotéases. Cette dégradation des fibres de collagène s'accompagne de la libération dans la circulation de fragments de fibres susceptibles d'être dosés au niveau sanguin ou urinaire qui constituent un bon reflet de la résorption osseuse (Dpd, Pyd, CTX, ICTP, Crosslaps, NTX).

Les ostéoclastes meurent par apoptose une fois la lacune de résorption creusée et sont remplacés par des macrophages qui vont nettoyer et lisser le fond de la lacune. C'est la phase d'inversion.

4.2- Phase de formation osseuse

Ces macrophages sont ensuite remplacés par des cellules souches mésenchymateuses, présentes dans la moelle, capables de se différencier en ostéoblastes. La différenciation des précurseurs ostéoblastiques mésenchymateux en cellules pré-ostéoblastiques non fonctionnelles puis en ostéoblastes matures capables de synthétiser une matrice ostéoïde s'accompagne de l'apparition plus ou moins précoce d'un certain nombre de marqueurs phénotypiques caractéristiques (figure 12 et tableau 1).

Diminution du potentiel de prolifération et augmentation de la différenciation

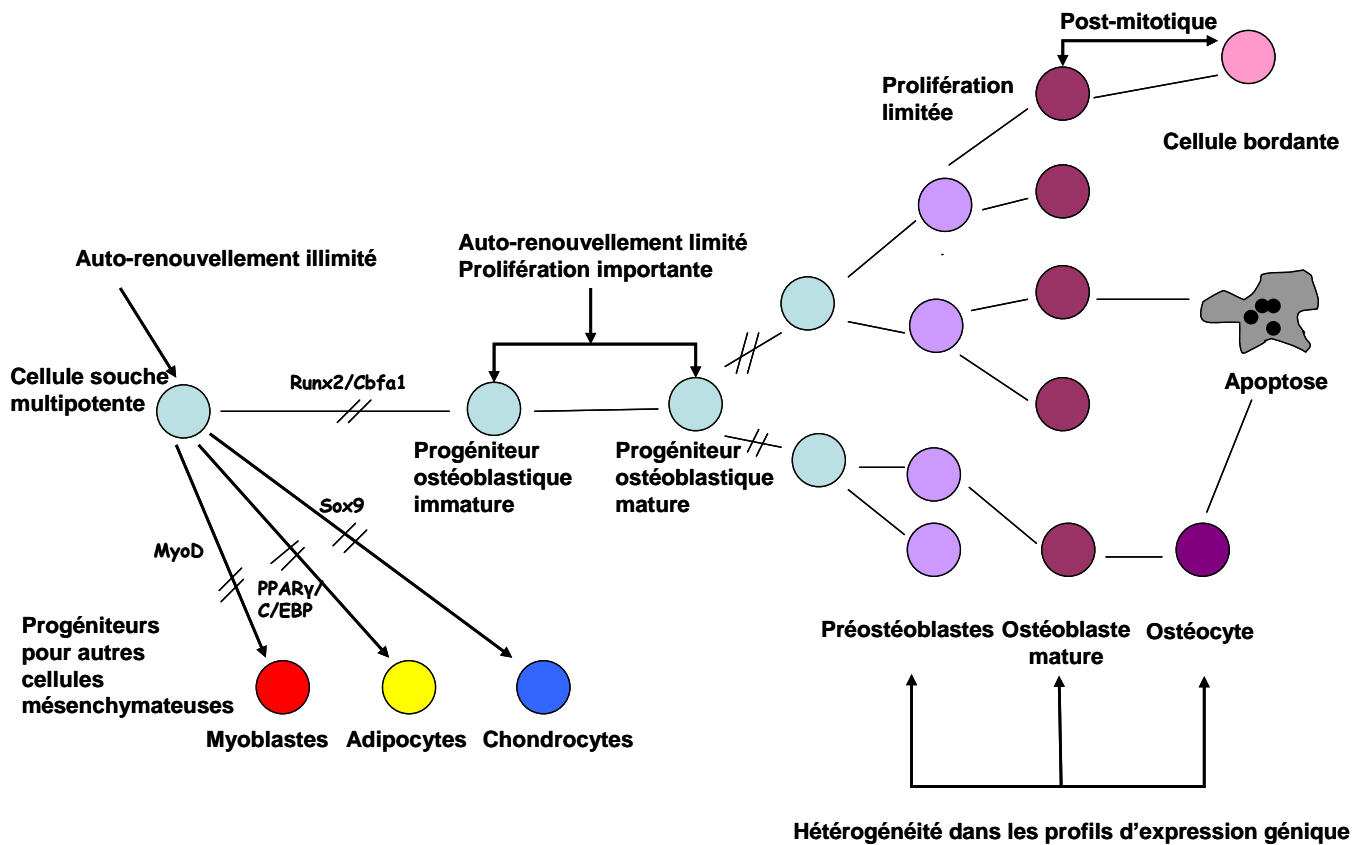


Fig. 12 : Etapes de prolifération et de différenciation de la lignée ostéoblastique, d'après Aubin, 2001 (70).

	Myoblastes	Adipocytes	Chondrocytes	Progéniteur ostéoblastique immature	Progéniteur ostéoblastique mature	Préostéoblastes	Ostéoblastes mature	Ostéocytes
Facteurs de transcription								
Runx2/Cbfa1	++?	++	?	?	?	?	++	?
Enzymes								
Phosphatase alcaline	?		-	-	+	++	+++	-
Phex	?		-	-	-	-	+++	+++
Protéines collagéniques et non collagéniques								
Collagène de type I	?		-	+	++	++	++	-
Ostéocalcine	-	-	-	-	-	-	- → +++	-
Sialoprotéine osseuse	-		-	++	-	- → +++	- → +++	- → +++
Ostéopontine	-/+?	+	-/+	-/+	-/+	- → +	- → +++	- → +++
Facteurs et Récepteurs								
PTH/PTHrP-R	?		-	-	-/+	+++	+++	++
PTHrP	?		-/+	-/+	+	++	++	-
-PDGF-R α	?		-/+	-/+	-/+	+++	+++	+++
Molécules d'adhésion								
CD44	?		-/+	-/+	-/+	+	++	++
Galectine 3	?		-/+	-/+	-/+	- → +	- → +++	- → +++

Tableau 1 : Facteurs impliqués dans la prolifération et la différenciation ostéoblastique, d'après Aubin, 2001 (70).

PTH/PTHrP-R et le PTH-rP apparaissent très précocement et se maintiennent tout au long de la différenciation ostéoblastique jusqu'au stade d'ostéocyte. De la même façon, l'expression du collagène de type 1 et de la phosphatase alcaline osseuse est très précoce, dès les stades de cellules progénitrices, et croît jusqu'au stade d'ostéoblastes matures (figure 12 et tableau 1). L'ostéopontine est exprimée très précocement et persiste alors que la sialoprotéine osseuse apparaît plus tardivement et est très exprimée chez l'ostéoblaste différencié. D'autres facteurs comme FGF23 sont également synthétisés à différents stades de la différenciation ostéoblastique (71-73). Enfin, comme pour la résorption, de nombreux facteurs hormonaux ou locaux comme les oestrogènes, l'insuline, l'hormone de croissance, les BMPs, les IGF-1 et-2 et le PDGF régulent la formation osseuse.

A la fin de l'étape de différenciation, l'ostéoblaste mature apparaît comme une cellule cuboïdale, riche en réticulum endoplasmique et en mitochondries avec un appareil de Golgi développé témoignant d'une intense activité de synthèse. Les ostéoblastes sont alignés le long de la matrice osseuse avant que celle-ci ne soit minéralisée (tissu ostéoïde). La période de formation osseuse dure environ 3 mois pendant lesquels les ostéoblastes élaborent les composants organiques de la matrice extracellulaire que sont les protéines collagéniques et en

particulier le collagène de type 1 et les protéines non-collagéniques comme l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse, la thrombospondine et la fibronectine. Sont également présents des protéoglycanes tels que le biglycane et la décorine et enfin l'ostéocalcine qui représente 20% des protéines non-collagéniques.

Après sa synthèse par les ostéoblastes, la matrice organique se minéralise progressivement par dépôt d'un sel de calcium et de phosphate apparenté à l'hydroxyapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2]$ entre les fibrilles de collagène.

A la fin de la phase de formation osseuse, le devenir des ostéoblastes peut suivre 3 voies :

- 65% meurent par apoptose

- 15% évoluent en ostéocytes, incapables de se diviser, siégeant dans des logettes appelées ostéoplastes et possédant des capacités limitées de synthèse et de résorption mais contribuant au maintien de la matrice osseuse et à l'homéostasie de la calcémie.

- 20% sont mis au repos et deviennent des cellules bordantes inactives (ou « *resting osteoblasts* » ou « *endosteal lining cells* »).

Dans les conditions normales, la surface osseuse peut rester quiescente durant des années avant qu'un nouveau cycle de remodelage ne débute au même site.

4.3- Facteurs influençant le contrôle de la masse osseuse

Le niveau de masse osseuse dépend à la fois de sa mise en place initiale lors de l'ostéogenèse et de son maintien à travers le contrôle du remodelage. Récemment, certains facteurs influençant directement la formation osseuse ont été décrits. Des boucles de régulation impliquant à la fois le métabolisme énergétique et osseux sont particulièrement importantes. Nous insisterons ici essentiellement sur le Lrp5.

L'identification de mutations de ce gène chez des patients atteints de désordres héréditaires associés à de fortes ou faibles masses osseuses comme dans l'OPPG (*Osteoporosis Pseudoglioma*) ouvrent les voies de la recherche sur ce gène dans le remodelage osseux et l'ostéoporose (74, 75).

La sérotonine, par le biais du taux d'AMPc dépendant de la protéine G_i , paraît jouer un rôle important dans le contrôle de l'ostéogenèse. Le Lrp5 (*lipoprotein related peptide 5*) conditionne par une voie Wnt-dépendante l'inhibition du tryptophane hydroxylase et la production de sérotonine. Ceci conduit au niveau de l'ostéoblaste à une baisse d'activité des récepteurs Htr2c et de la protéine G_i , et à une augmentation de l'AMPc, ce qui est favorable à

la formation osseuse (33, 76). Ces travaux ont été élargis au rôle possible de la production de sérotonine par le système nerveux central sous l'effet de la leptine (37). La sérotonine provenant du cerveau aurait une influence plus importante, même pour une production moindre, sur le remodelage osseux que celle produite par les cellules entérochromaffines (33, 77) (figure 13).

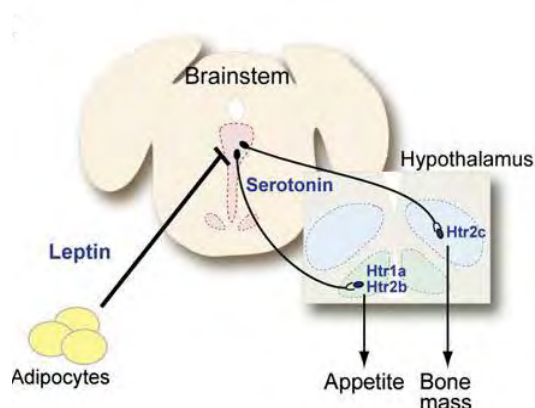


Fig. 13 : Régulation de la masse osseuse et de l'appétit par la leptine. La leptine inhibe la sérotonine dérivée du tronc cérébral entraînant une diminution de la masse osseuse et de l'appétit (77).

Ces travaux récents mettent en avant l'effet bipolaire de plusieurs de ces médiateurs tels que la leptine, la sérotonine et aussi sans doute la ghreline sur la masse osseuse, en agissant à la fois au niveau du système nerveux central et au niveau de l'ostéoblaste. Ils mettent aussi en évidence le rôle prépondérant de contrôle du taux d'AMPc pour l'ostéogenèse. Il est intéressant de noter que le LPA dont les effets majeurs sont de type G_i peut venir s'intégrer dans ce contexte. En outre, de même que les médiateurs précédemment cités, le LPA agit à la fois sur le métabolisme osseux et énergétique.

Le développement radiculaire dentaire et parodontal

Le développement dentaire est le résultat d'une suite d'évènements morphologiques complexes, régulés génétiquement (78). Au cours de la morphogenèse dentaire, la première structure mise en place est la couronne. A la fin de son édification les différentes structures présentes sont la dentine coronaire, en regard de celle-ci l'émail qui est encore faiblement minéralisé, l'os alvéolaire qui est complet et intact et des structures vasculaires et nerveuses (figure 14).

Le développement de la racine dentaire, que nous allons détailler, ne commence que lorsqu'une grande partie des tissus durs coronaires sont déposés, c'est à dire au moment où la couronne a atteint sa dimension finale avec une épaisseur suffisante d'émail et de dentine (79) (figure 14). D'importantes interactions épithélio-mésenchymateuses vont réguler la formation des racines et du parodonte (tissu de soutien de la dent) (figure 14). Elles mettent en jeu des facteurs en partie communs avec ceux impliqués dans la différenciation ostéo-chondrocytaire.

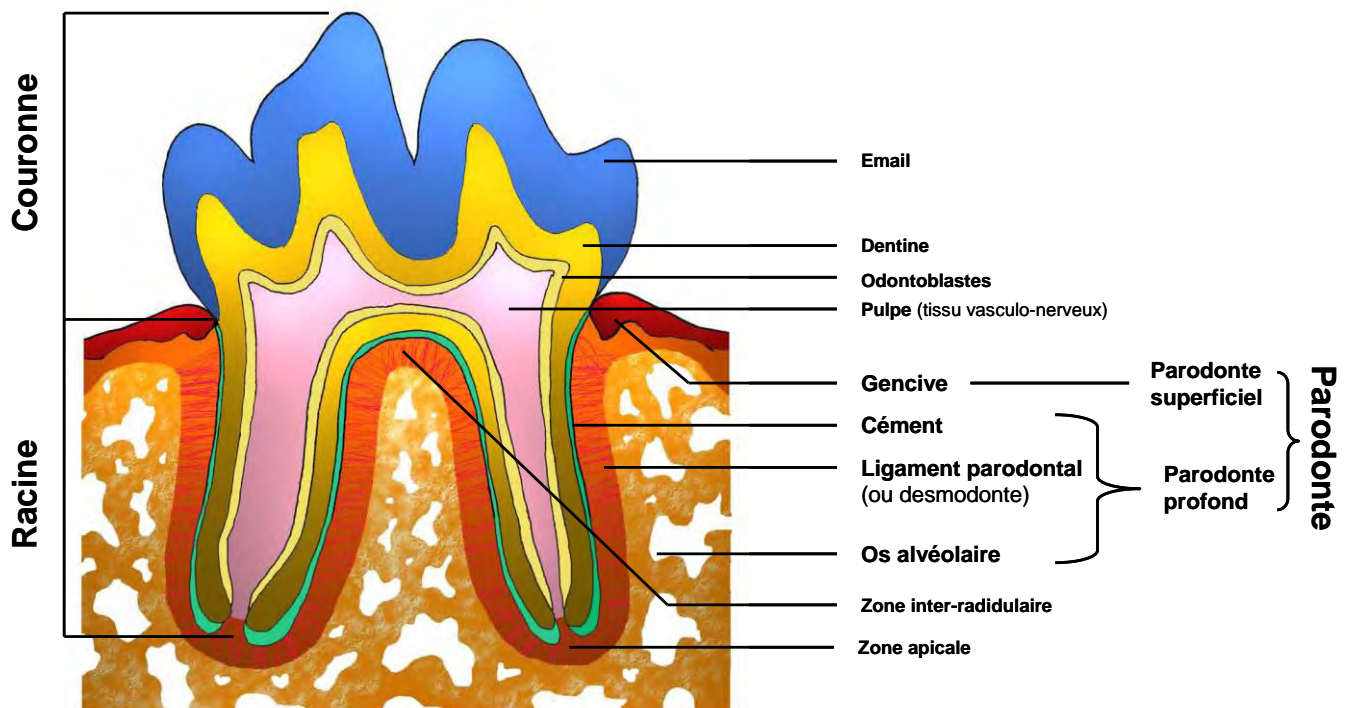


Fig. 14 : Représentation schématique d'une molaire mandibulaire

1- Cinétique de l'édification radiculaire.

En préalable à ce travail de thèse, nous avons étudié l'évolution radiculaire de la première molaire mandibulaire de la souris en réalisant des coupes histologiques sériées de J4.5 à J28 *ex utero* (80). Nous avons ainsi pu mettre en évidence quatre stades dans ce développement radiculaire ou rhizagenèse (figure récapitulative 19 page 47) qui débute par la mise en place d'une structure épithéliale transitoire, la gaine épithéliale de Hertwig (GEH) et se termine par la mise en place de la dent sur l'arcade, à la fin de son éruption, dans la cavité buccale. Cette GEH est une structure indispensable qui va servir de trame à la formation de la racine mais aussi au développement du parodonte (structure de soutien de la dent dans l'os maxillaire).

- **Stade I : mise en place de la GEH (J4 à J4,5 ex utero) (figure 15) :**

L'édification radulaire débute alors que la couronne n'a pas encore tout à fait terminée sa croissance.

Ainsi la différenciation des derniers améloblastes sécréteurs (cellules formatrices de l'émail) se fait au niveau du futur collet, parallèlement à l'accolement de l'épithélium adamantin (de l'émail) interne (EAI) et externe (EAE) au niveau de la boucle cervicale formant une structure appelée gaine épithéliale de Hertwig (figures 15 et 19).

La mise en place de la gaine épithéliale de Hertwig s'observe au niveau du futur collet mais également au niveau de la future zone inter-radulaire.

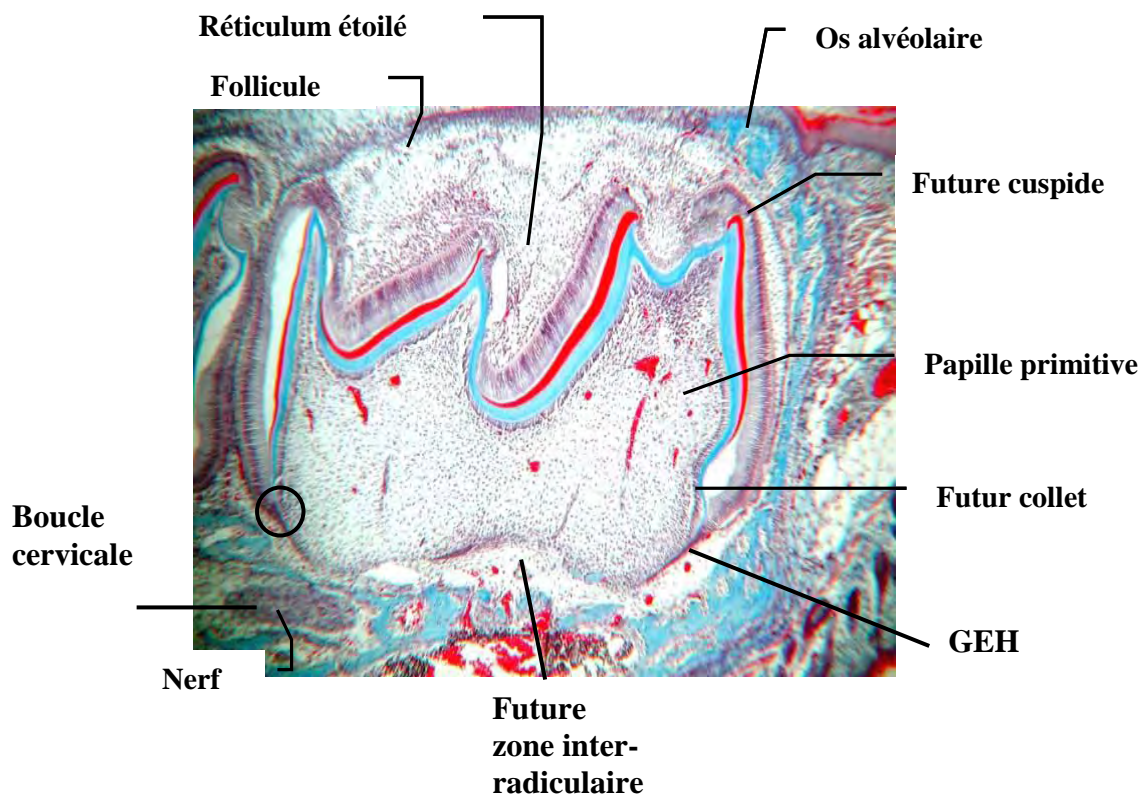


Fig. 15 : Stade I : mise en place de la G.E.H (J4, x63). (80).

- **Stade II : début de l'édification radulaire (J5 à J6,5 ex utero) (figure 16):**

La GEH continue sa mise en place par une croissance horizontale et forme le diaphragme épithélial (figure 16A).

A ce niveau là, les premiers odontoblastes se différencient et sécrètent la première dentine radulaire. Ces dépôts de dentine radulaire semblent être plus précoce au niveau de la zone inter-radulaire (individualisation du plancher) (figure 16B).

En outre, la vascularisation augmente au niveau de la papille et sous le germe dentaire (au niveau de la zone inter-radulaire).

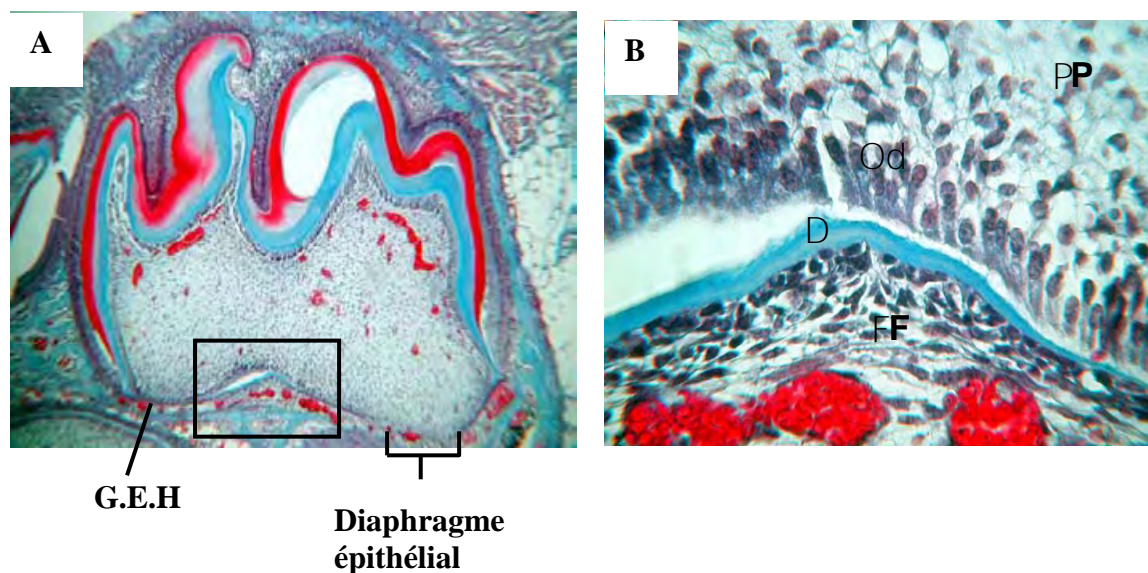


Fig. 16 : Stade II : début de l'édification radulaire. **A :** germe dentaire à J6.5 (x63), croissance horizontale de la GEH et formation du diaphragme épithélial ; **B :** zone inter-radulaire à J6.5 (x630) avec mise en place de la dentine radulaire (**D**). **PP :** papille primitive ; **Od :** odontoblastes radulaires ; **FF :** follicule fibreux (80).

- **Stade III : édification du premier tiers radiculaire (J7 à J13 ex utero) (figure 17) :**

A ce stade l'élongation radiculaire verticale et la morphogenèse de la zone inter-radiculaire se font de manière conjointe (figures 17 A et B). Le foramen apical primaire par lequel les éléments vasculo-nerveux vont pénétrer la papille primitive s'individualise.

L'élongation radiculaire verticale se fait par déroulement apical de l'extrémité de la GEH contre laquelle se dépose la dentine pariétale.

Au niveau cervical, la GEH se fragmente et il y a infiltration de cellules folliculaires contre la dentine radiculaire (flèches noires figure 17 E). Les fragments de la GEH formeront les débris épithéliaux de Malassez (encadré figure 17 E).

Le premier ciment se dépose, d'abord au niveau inter-radiculaire (J8), puis secondairement au niveau cervical et pariétal (J10) (figures 17 C et D).

Les fibres de collagène du desmodonte apparaissent initialement comme une frange à la surface du ciment cervical (J10). Plus tardivement, ces fibres s'incluront dans le ciment, notamment au niveau de la zone inter-radiculaire où leur orientation deviendra oblique (J13) (encadré figure 17 F).

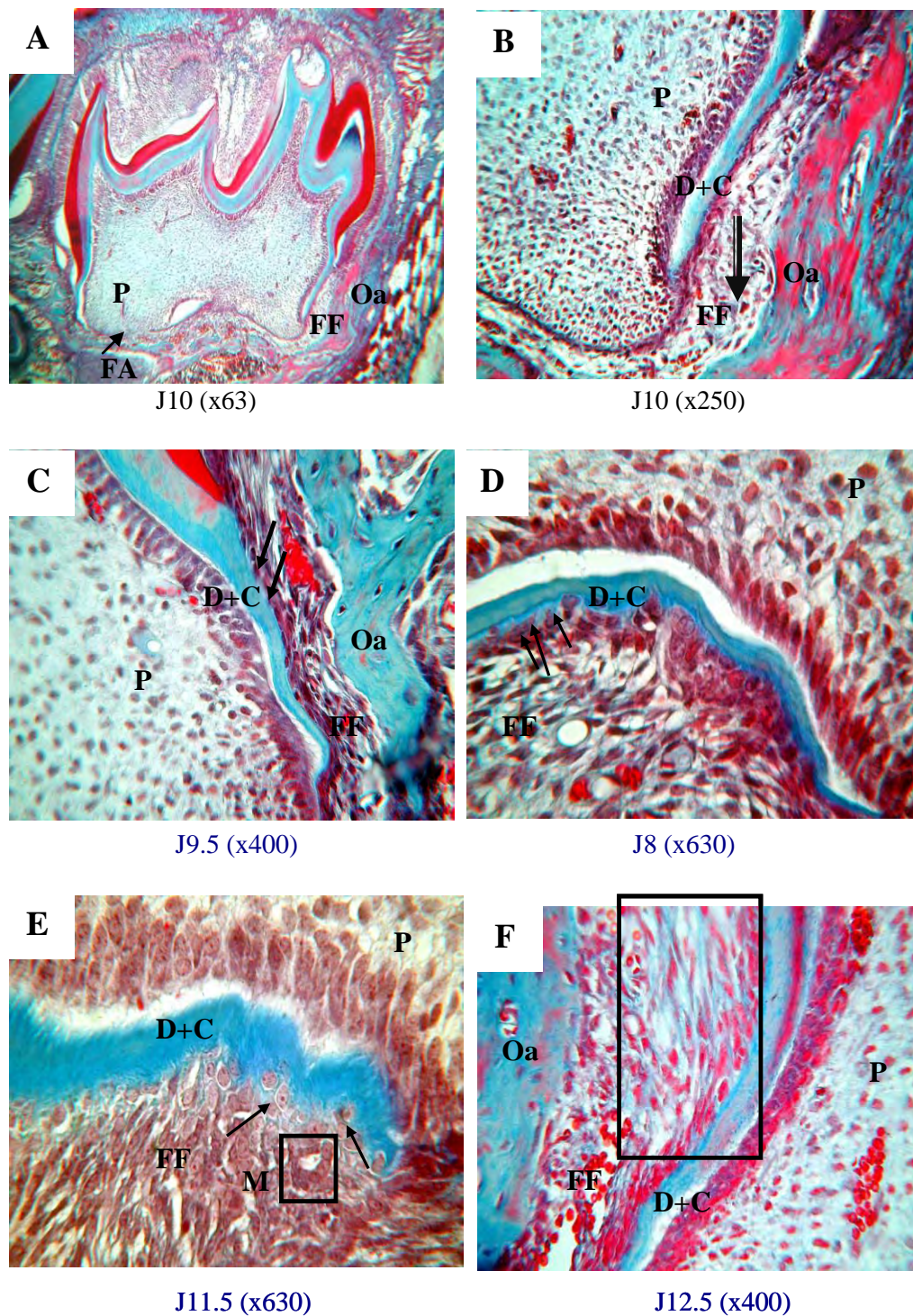


Fig. 17 : Stade III : édification du premier tiers radiculaire. **A :** germe dentaire à J10 (x63) (flèche noire : foramen apical primaire); **B :** élongation radiculaire verticale (flèche) par déroulement apical de la GEH ; **C et D :** dépôt du premier ciment au niveau inter-radculaire (**D**) et pariétal (**C**) par les cimentoblastes (flèches noires) ; **E :** débris épithéliaux de Malassez provenant de la fragmentation de la GEH (encadré) ; **F :** orientation oblique des fibres de collagène (encadré). **D+C:** dentine+cément ; **FA :** foramen apical primaire ; **FF :** follicule fibreux ; **Oa :** os alvéolaire ; **P :** pulpe ; **M :** débris épithéliaux de Malassez (80).

- **Stade IV : édification du second tiers radiculaire (J13,5 à J18 ex utero) (figure 18) :**

Le rythme des dépôts de dentine radiculaire et de ciment augmente, avec individualisation des différents types de ciment et des fibres desmodontales. La dentine radiculaire croît en longueur et en épaisseur (figure 18 A).

Au niveau pariétal externe, des cellules de type fibroblastique incluses dans des fibres de collagène bordent la paroi cémentaire (ciment acellulaire). Ces fibres de collagène perpendiculaires à la paroi cémentaire sont les fibres de Sharpey (figure 18 B).

Au niveau pariétal interne et inter-radiculaire, on observe des inclusions cellulaires dans le néocément (ciment cellulaire) (flèches noires figure 18 C). Les fibres desmodontales sont également perpendiculaires à la paroi radiculaire.

Au niveau apical, près du diaphragme épithélial, des cellules commencent également à s'inclure dans le ciment pariétal (ciment cellulaire) (flèches noires figure 18 D). Les fibres de cette zone sont moins denses et parallèles à la paroi radiculaire.

L'éruption (J15) se produit par accollement entre l'épithélium gingival et l'épithélium adamantin réduit (EAR), issu de la fusion entre les reliquats de l'organe de l'émail : améloblastes post-sécréteurs, stratum intermedium, et épithélium adamantin externe (figures 18 et 19).

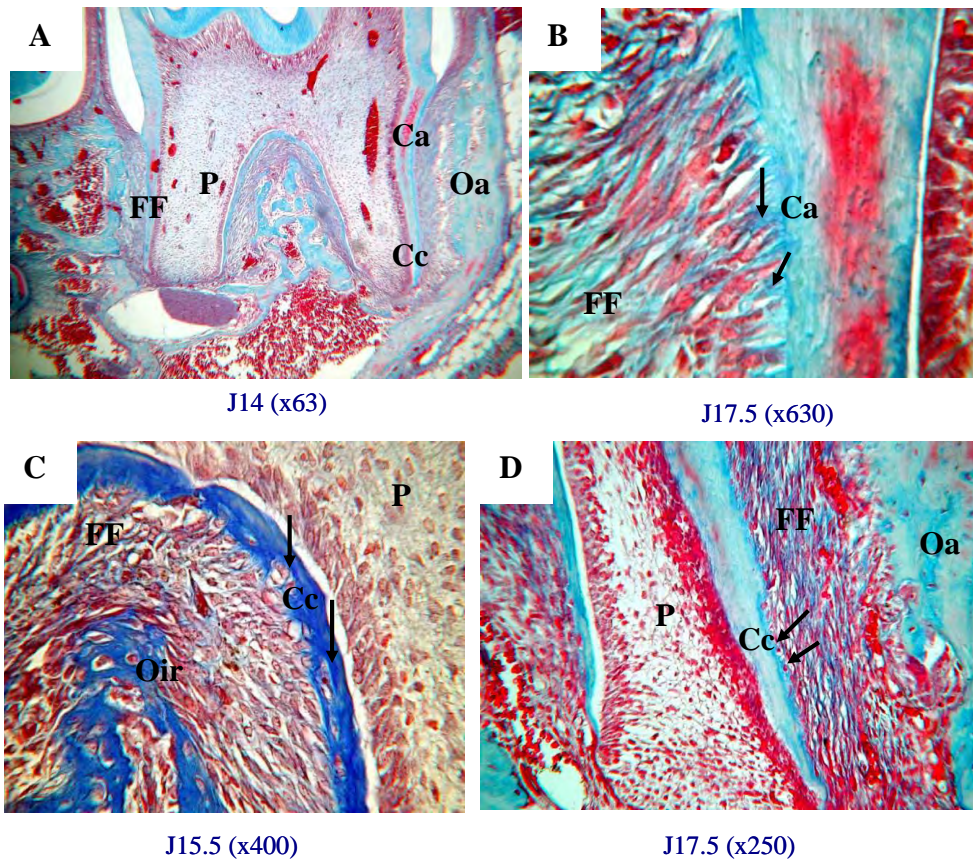


Fig. 18 : Stade IV : édification du second tiers radiculaire. **A :** germe dentaire à J14 (x63) ; **B :** fibres de Sharpey incluses dans le ciment (flèches noires) ; **C :** inclusions de cimentoblastes dans le ciment inter-radriculaire ; **D :** inclusion de cimentoblastes dans le ciment cellulaire pariétal (flèches noires). **Ca :** ciment acellulaire ; **Cc :** ciment cellulaire ; **FF :** follicule fibreux ; **Oa :** os alvéolaire ; **Oir :** os inter-radriculaire ; **P :** pulpe (80).

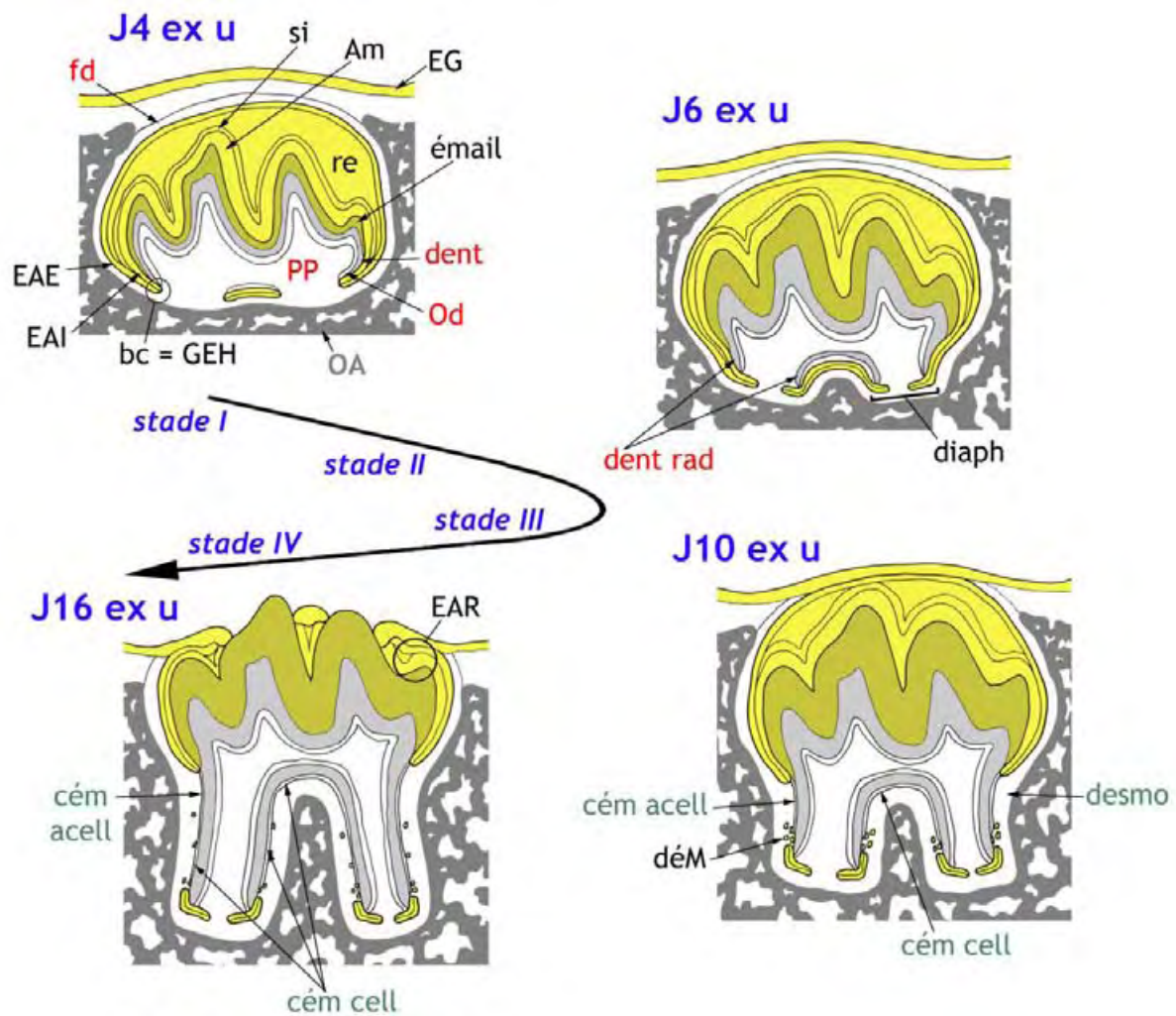


Fig. 19 : Représentation schématique du développement radiculaire de la 1^{ère} molaire mandibulaire de souris. Les structures épithéliales sont en jaune et noms noirs ; les structures mésenchymateuses en blanc et noms rouges ; exception faite de l'os en gris, et du ciment en blanc. **Am**, améloblastes ; **bc**, boucle cervicale ; **cém acell**, ciment acellulaire ; **cém cell**, ciment cellulaire ; **déM**, débris épithéliaux de MALASSEZ ; **dent**, dentine ; **dent rad**, dentine radulaire ; **desmo**, desmodonte ; **diaph**, diaphragme épithélial ; **EAE**, épithélium adamantin externe ; **EAI**, épithélium adamantin interne ; **EAR**, épithélium adamantin réduit ; **EG**, épithélium gingival ; **fd**, follicule dentaire ; **GEH**, gaine épithéliale de Hertwig ; **OA**, os alvéolaire ; **Od**, odontoblastes ; **PP**, papille primitive ; **re**, réticulum étoilé ; **si**, stratum intermedium (81).

2- Les différents composants du parodonte :

Le parodonte est une structure d'ancrage de la dent dans l'os maxillaire. Il est divisé en parodonte superficiel et profond. Le parodonte superficiel est constitué par la gencive. Le parodonte profond est un ensemble de 3 tissus (figure 14):

- le ciment (qui constitue la partie externe minéralisée de la racine dentaire),
- l'os alvéolaire,
- le desmodonte ou ligament parodontal (qui relie l'os alvéolaire au ciment radiculaire).

2.1- La gaine épithéliale de Hertwig-von-Brünn :

2.1.1- Origine

A la fin de l'édification coronaire, au stade cloche, une structure appelée gaine épithéliale de Hertwig-von-Brünn (G.E.H.) se forme au niveau de la zone du futur collet anatomique. Elle résulte de l'accolement de deux feuillets épithéliaux, l'épithélium adamantin interne et externe (E.A.I et E.A.E.) et va être à l'origine du développement radiculaire (figures 19 et 20). Entre l'os alvéolaire et la racine se trouve le follicule fibreux (FF) qui participera aussi à l'édification radiculaire (figures 16A et 16B).

Sous l'effet des mitoses, la gaine épithéliale se développe et s'allonge d'abord perpendiculairement puis parallèlement à l'axe de la racine (figures 16, 17 et 20). La racine primitive est également traversée en son centre par les éléments vasculo-nerveux qui infiltreront la papille primitive par le foramen apical primaire (figures 17 et 21).

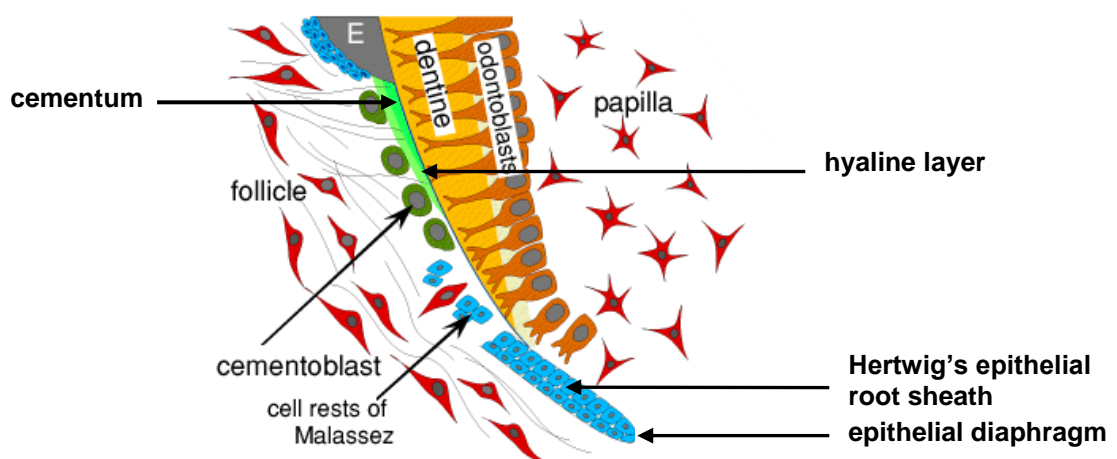


Fig. 20 : Représentation schématique de l'initiation de la formation radiculaire.

(hyaline layer = zone hyaline ou jonction cémento-dentinaire)

Le diaphragme épithélial (figures 20 et 21) peut être divisé en trois parties sensiblement égales en fonction de la morphologie des cellules en regard de celui-ci. On observe des cellules mésenchymateuses disposées irrégulièrement face au tiers le plus apical. Face au tiers moyen, les cellules pulpaire s'alignent en couche et émettent de longs pseudopodes, signes de la différenciation pré-odontoblastique. Enfin, dans le tiers le plus coronaire, une assise d'odontoblastes polarisés est visible contre la membrane basale. Cette morphodifférenciation suggère fortement le passage d'un message inducteur d'origine épithéliale (1, 79).

Le déroulement de la gaine qui accompagne la dent vers sa position éruptive aboutit à la formation de la plus grande partie de la racine (2/3 à 3/4) (figures 17 et 18). Le diaphragme garde un niveau presque constant dans le maxillaire. Keney et Ramfjord en 1969 puis Héritier et Fernandez en 1981 ont étudié, grâce à la 3H-thymidine, les mitoses à l'origine du déroulement de la gaine dans le sens éruptif, mais les résultats sont contradictoires. Les uns les situent au niveau de la couche interne du diaphragme (82), les autres au niveau de la couche externe (83).

Pour les dents pluriradiculées, l'anneau diaphragmatique émet selon le cas deux ou trois prolongements qui vont se rejoindre en direction centripète en fragmentant la papille et le foramen. On obtient donc deux ou trois anneaux qui évoluent individuellement et se comportent comme autant de gaines épithéliales. L'organisation vasculo-nerveuse va suivre cette fragmentation (figure 21).

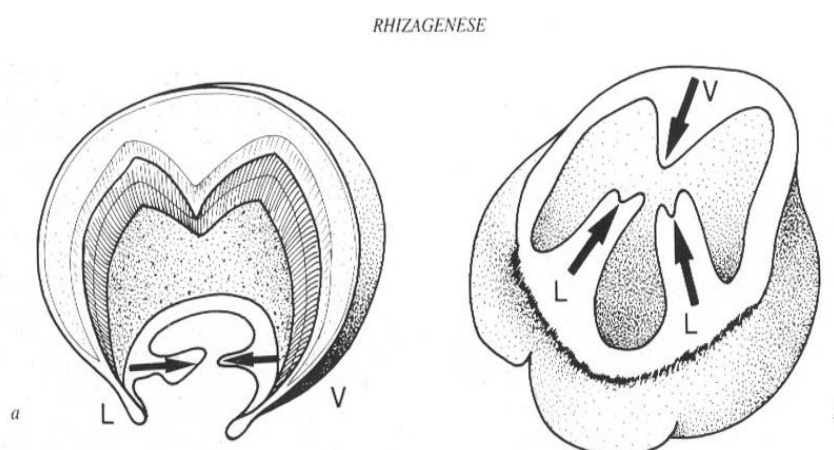


Fig. 21 : Evolution des languettes épithéliales diaphragmatiques chez les pluriradiculées : a- prémolaire à 2 racines ; b- première molaire supérieure. L : lingual ; V : vestibulaire ; flèches noires diaphragme épithélial délimitant le foramen apical primaire (79).

2.1.2- Rôles et devenir

Deux types d'interactions épithélio-mésenchymateuses sont mis en jeu lors de l'édification radiculaire.

La première, entre la GEH et les cellules de la papille primitive va être à l'origine de la différenciation des odontoblastes radiculaires de la même façon que les interactions entre l'épithélium adamantin interne et la papille primitive étaient à l'origine de la dentine coronaire. La GEH conserve donc le pouvoir d'interagir avec la papille mais perd celui de se différencier en retour pour donner des améloblastes. Des facteurs de croissance et de différenciation comme *Sonic hedgehog* (Shh), les *Bone Morphogenetic Proteins* et leurs récepteurs (BMP et BMPR) et des amélogénines (protéines de la matrice amélaire) présents dans la GEH vont être libérés et être à l'origine de la différenciation des odontoblastes radiculaires (1, 84-86).

Le second type d'interaction épithélio-mésenchymateuse concerne la GEH et le follicule fibreux dentaire pour la formation du parodonte. Les cellules épithéliales de la GEH sécrètent là aussi des dérivés de la matrice amélaire, des BMPs et des protéines de dégradation de la membrane basale apportant ainsi un environnement favorable à la formation des différentes structures du parodonte (os alvéolaire, ciment et ligament parodontal) (1, 84, 87, 88).

Enfin, d'autres facteurs comme l'*Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1) et l'*Epithelial Growth Factor* (EGF) sécrétés par les tissus mésenchymateux environnants semblent aussi influencer le développement et devenir de la GEH (89, 90).

Les odontoblastes radiculaires déposent en continuité avec les odontoblastes coronaires la matrice prédentinaire jusqu'à ce que la hauteur totale de la racine soit parcourue. La dentine radiculaire s'agrége à la dentine coronaire sans démarcation. La formation de la première partie de la racine entraîne la rupture de la gaine de Hertwig avec l'organe de l'émail (83). La gaine va se dissocier au fur et à mesure de l'apparition dentinaire longitudinale. Les cellules de la couche externe se répandent dans le follicule et dégénèrent donnant les débris épithéliaux de Malassez (figure 17 E). La gaine de Hertwig reste cohésive jusqu'à la zone de développement de la prédentine identifiable par l'abondance de matériel collagénique et l'existence d'îlots de minéralisation.

Plusieurs mécanismes peuvent être envisagés concernant le devenir des cellules de la GEH. Le premier est l'apoptose, le second est leur incorporation dans le font de

minéralisation cémentaire, le troisième est leur migration à distance de la racine et le dernier leur transformation épithélio-mésenchymateuse (91, 92).

2.2- Le ciment :

2.2.1- Généralités :

Le ciment est un tissu dur minéralisé d'origine conjonctive qui recouvre la dentine radiculaire par une couche ininterrompue mais d'épaisseur variable. En fonction des espèces animales étudiées, de l'anatomie topographique, du rythme et des séquences de dépôt, les ciments ont des aspects très variables. Il semblerait que les ciments se déposent par couches successives et rythmées et que cette apposition soit intermittente tout au long de la vie. Le ciment mature est le moins minéralisé des trois tissus durs de la dent. Les composés minéraux représentent environ 65% du poids humide, les substances organiques environ 23% et l'eau, les 12% restants. La matrice inorganique est constituée pour 50% d'hydroxyapatite. L'analyse des acides aminés composant la matrice organique a montré que le collagène représente pratiquement 90% du total des protéines de la matrice cémentaire (essentiellement du collagène de type I et III). La matrice organique contient aussi d'autres protéines non fibreuses parmi lesquelles la sialoprotéine osseuse, l'ostéopontine, la ténascine, la fibronectine, l'ostéonectine et des protéoglycanes (93-95).

Si l'on compare le ciment à l'os alvéolaire, on note un certain nombre de ressemblances : la même origine mésenchymateuse, les cémentoblastes du ciment cellulaire peuvent être inclus dans le tissu dur, comme les ostéoblastes, enfin les fibres de Sharpey qui sont incluses dans le ciment et l'os (96) (figure 18 B). Il existe cependant quelques différences entre les deux tissus. En effet, le ciment n'est ni vascularisé ni innervé, il est moins minéralisé que l'os et il résiste mieux à la résorption (96).

La jonction amélo-cémentaire a été classifiée par Hopwell-Smith en trois catégories :

- dans 60% des cas les deux tissus sont en contact sans recouvrement (émail et ciment sont en bout à bout).
- dans 30% des cas, le ciment recouvre légèrement l'émail. Cela se produit lorsque une partie de l'épithélium adamantin réduit est dissociée et que le conjonctif se trouve alors au contact de l'émail. Les cémentoblastes se développent et le ciment se forme sur l'émail.

- enfin, dans 10% des cas, il existe un hiatus entre les deux tissus et la dentine est mise à nu. Cela se produit quand la gaine de Hertwig ne se désintègre pas et empêche le tissu conjonctif de venir au contact de la dentine.

Schröder en 1985 a fait remarquer que ces dispositions pouvaient être retrouvées sur une même dent (92).

2.2.2- Origine et formation :

Au fur et à mesure de sa progression vers l'apex, la gaine épithéliale s'écarte de la dentine radiculaire, s'étire et se fragmente. La dentine radiculaire entre alors en contact avec le sac folliculaire (figure 20).

Dès lors, la surface dentinaire fraîchement exposée paraît exercer morphologiquement un puissant effet de tropisme positif sur les cellules de l'investing layer (du follicule fibreux). Ces éléments de la couche interne, cellules, substance fondamentale et précurseurs fibreux, colonisent la surface dentinaire. Ces cellules de l'investing layer vont se déposer et s'orienter obliquement par rapport à l'axe de la dent en s'insinuant entre les cellules de la gaine en cours de dissociation (83). Bossardt et Selvig ont montré, en marquant des cellules du follicule par la ³H-thymidine, la migration de cellules de ce compartiment vers la surface radiculaire (97). Cependant, d'autres auteurs ont montré que les cémentoblastes marqués pouvaient aussi être d'origine épithéliale car des cellules de l'organe de l'émail donnant la GEH, incorpore aussi la ³H-thymidine. L'hypothèse a donc été émise que les cémentoblastes pouvaient être originaires de la GEH qui subirait une transformation épithélio-mésenchymateuse (91, 97). Cette théorie qui proposait une origine directe des cémentoblastes à partir de la GEH s'appuyait sur le fait que l'on n'avait jamais pu prouver que les cellules folliculaires étaient capables de se différencier en cémentoblastes, ostéoblastes ou fibroblastes du ligament (98).

Aujourd'hui, la théorie de la transformation ecto-mésenchymateuse des cellules de la GEH en cémentoblastes (91, 96) semble être abandonnée pour celle de l'origine folliculaire des cémentoblastes (1, 99-101) (figures 20 et 26).

Cependant, quelle que soit l'origine des cémentoblastes, la GEH est nécessaire à la formation du complexe d'attache parodontal (102).

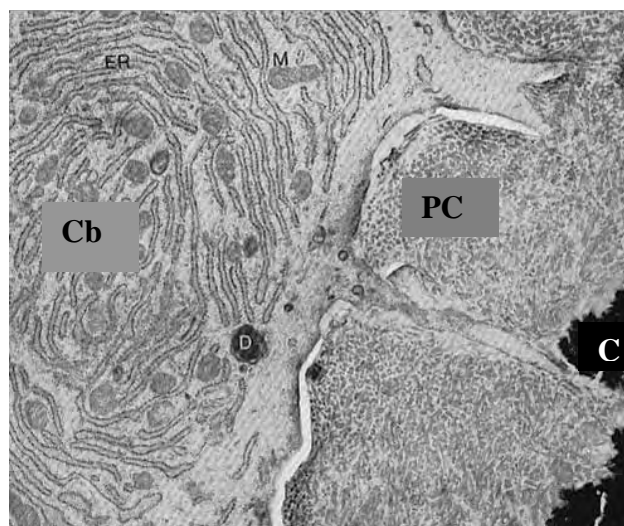


Fig. 22 : Image en microscopie électronique à transmission d'un cémentoblaste (Cb) avec le précément ou couche cémentoïde (PC) et le ciment (C).

La première couche de matrice cémentoïde est en général désignée sous le nom de précément (figure 22). Au niveau du ciment fibrillaire, il recouvre le ciment sur une épaisseur de 3 à 5 μm . Au niveau du ciment cellulaire son épaisseur est plus importante. Cette couche de précément se situe entre les cémentoblastes et la surface cémentaire. Cette zone contient de nombreuses fibres de collagène (90% de collagène et 10% de protéines non collagéniques). La minéralisation de ce précément débute en profondeur par des dépôts de cristaux sur les fibres de collagène puis entre les fibres. Le processus de minéralisation est semblable à celui de la minéralisation osseuse. La limite entre la dentine et le précément est souvent difficile à mettre en évidence, mais la transition entre précément et ciment est nette et marquée par le front de minéralisation que l'on peut mettre en évidence par des marqueurs fluorescents.

La couche granuleuse de Tomes ou zone hyaline de Hopewell-Smith ou jonction dentino-cémentaire est irrégulière (figure 20). Elle est nette au niveau du ciment fibrillaire, mais au niveau du ciment cellulaire on rencontre une zone plus floue de ciment contenant des inclusions protoplasmiques. Le ciment à ce niveau-là est plus minéralisé et contient peu de fibres collagéniques (103).

Actuellement cinq types de ciments ont été identifiés et classifiés en fonction de leur teneur en fibres et en cellules. On distingue : le ciment acellulaire et afibrillaire, le ciment acellulaire à fibres extrinsèques C.A.F.E., le ciment cellulaire à fibres intrinsèques, le ciment

acellulaire à fibres intrinsèques et le ciment cellulaire à fibres intrinsèques ou extrinsèques (92, 104, 105).

2.2.3- Les cellules folliculaires :

Des études récentes ont montré que les cellules folliculaires avaient des potentiels de différenciation proche de ceux des cellules souches mésenchymateuses (1, 106-110).

Des études récentes ont montré qu'une sous-population de cellules folliculaires peut donner *in vivo* et *in vitro* une matrice de type cémentoïde (110, 111). Parvenues au contact des spicules dentinaire, ces cellules folliculaires vont présenter des signes de différenciation suggérant des capacités sécrétrices par le développement important de leur réticulum endoplasmique et de leur appareil de Golgi. Au même moment, un réseau dense et désordonné de fibrilles de collagène s'accumule contre la racine. La densification des fibrilles déposées et leur mélange avec la substance fondamentale vont conduire à la formation d'une couche matricielle cémentoïde faite de 90% de collagène I. Les cellules d'origine folliculaire peuvent dès lors être qualifiées de cémentoblastes (112). Il est possible que la faible minéralisation de la dentine en surface facilite l'intrication des matrices et le pontage des fibrilles collagéniques respectives.

2.2.4- Les cellules cémentoblastiques :

Les mécanismes de différenciation cémentoblastiques de ces cellules folliculaires sont encore peu connus (84, 85, 113, 114). La GEH, par l'expression de certains facteurs comme les BMP et les dérivés de la matrice de l'émail (amélogénines) (2, 84, 85, 97, 115-118) joue sans doute un rôle clé dans l'orientation des cellules folliculaires vers le phénotype ostéoblastique ou cémentoblastique (1, 107, 108) (figure 26 page 63). Un principe thérapeutique délivré sous forme de gel dit de «protéines dérivées de la matrice amélaire ou EMD » et présenté comme composé essentiellement d'amélogénines (extraits d'émail immature porcin) est commercialisé dans le cadre de thérapeutiques parodontales (119). Plus récemment, il a été montré que les BMP entraient aussi dans la composition de ces EMD (1, 118) et que ce gel entraînait la différenciation cémentoblastique et la régénération parodontale chez l'homme (1, 115, 118). Les EMD agiraient comme facteur de croissance en entraînant la prolifération, la migration, l'adhésion et la différenciation cellulaire (120).

Le cémentoblaste reste mal connu, difficile à différencier de l'ostéoblaste et possède peu de marqueurs spécifiques (1, 121, 122). Comme l'ostéoblaste, il exprime différentes protéines matricielles spécifiques des tissus minéralisés comme le collagène de type I, la sialoprotéine osseuse, l'ostéopontine...(99). La *Cementum Attachment Protein* (CAP) qui est une protéine d'adhésion au ciment est considérée comme un bon marqueur spécifique (99, 111). Une autre protéine la *Cementum Protein 23* (CP-23) isolée à partir d'un cémentoblastome et dont le rôle reste encore inconnu est exprimée dans les cémentoblastes et quelques précurseurs cellulaires du ligament parodontal (99, 122). Nous avons retenu ces deux dernières (CAP et CP-23) comme marqueur spécifique du cémentoblaste dans notre travail (voir chapitre II et annexes).

Le ciment se dépose sur la surface radiculaire pendant le développement radiculaire et après l'éruption dentaire lors de la mise en fonction de la dent. Les cémentoblastes sont des cellules cuboïdales que l'on retrouve aussi bien au niveau du ciment cellulaire qu'acellulaire (figures 18 B, C et D). Ces cellules sont interposées entre les faisceaux de fibres desmodontales et du fait de leur localisation elles sont considérées comme des cellules appartenant au desmodonte (figure 18 B). Ces cellules sont localisées au niveau de la surface radiculaire et ont les caractéristiques ultrastructurales de cellules actives, sécrétrices. Elles possèdent un noyau ovalaire (dont la surface est ondulée), un réticulum endoplasmique ainsi qu'un appareil de Golgi développé, des mitochondries renfermant des granulations et dont le centre est plus clair et enfin des microtubules et des microfilaments (figure 22).

Les cémentocytes sont des cellules logées dans des lacunes cémentaires ou cémentoplastes au niveau du ciment cellulaire apical et inter-radicaire. Elles possèdent des prolongements qui sont contenus dans les canalicules et qui permettent des contacts avec les cellules voisines par des jonctions serrées. Les prolongements des cémentocytes sont dirigés vers le desmodonte qui constitue la source nutritive du ciment. Près de la surface cémentaire, les cémentocytes ressemblent beaucoup aux cémentoblastes, mais plus on s'éloigne de cette surface, moins leur cytoplasme est développé et plus l'activité cellulaire est réduite.

2.2.5-Physiopathologie du ciment :

On reconnaît au ciment trois fonctions principales :

- d'ancrage de la dent dans l'os alvéolaire par l'intermédiaire des fibres de Sharpey
- compensation par sa croissance de la perte de substance dentaire résultant de l'attrition occlusale (l'usure dentaire)
- contribution par sa croissance à l'éruption continue de la dent.

Les modifications de la position de la dent, quelle qu'en soient les raisons, perturbent l'arrangement des fibres desmodontales et le ciment formé à cet instant particulier contiendra des fibres angulées différemment par rapport à la surface de la racine.

Le dépôt continu de ciment est d'une importance biologique majeure. Dès que la vitalité d'une couche de ciment décroît, les cémentoblastes issus du desmodonte bordant s'activent et la remplacent par une couche de ciment plus superficielle, afin de maintenir l'intégrité du système d'attache parodontal.

Bien qu'il existe une relation linéaire entre l'âge et l'épaisseur du ciment, le rythme de dépôt du tissu est différent selon les zones de la dent : il est ralenti près de la jonction amélo-cémentaire et accéléré au niveau de l'apex. Par ailleurs, certains auteurs estiment que l'épaisseur notable de la couche de ciment faisant face aux pertuis alvéolaires communiquant avec l'endoste permet d'attribuer une origine alvéolaire aux pré-cémentoblastes.

Les hormones jouent un rôle certain dans les échanges minéraux et le maintien de la charge calcique du ciment :

- la cortisone (à la dose de 0,5 mg par jour et par kg de poids pendant 6 semaines) s'avère à l'origine de la résorption cémentaire, chez le rat. La surrénalectomie a pour effet de diminuer l'activité des ostéoblastes (surtout) et des cémentoblastes (légèrement), mais l'injection de 0,25 mg d'acétate de cortisone par jour et par kg de poids restaure la fonction des cellules blastiques.
- les œstrogènes stimulent le dépôt de composés minéraux, tout en inhibant la croissance du tissu, provoquant donc sa sclérose.
- L'administration d'androgènes provoque la synthèse de glycosaminoglycanes sulfatés, à l'origine de la croissance du ciment et des tissus minéralisés en général

- L'animal diabétique montre des résorptions cémentaires.
- La parathormone provoque une déminéralisation alors que la thyro-calcitonine stimule la minéralisation.
- L'acromégalie (hypersécrétion de la STH, hormone somatotrope, sécrétée par l'hypophyse) est à l'origine d'une accumulation de ciment (accessoirement aux hyperostoses).

2.3- L'os alvéolaire :

Les os du maxillaire et de la mandibule se développent à partir du premier arc branchial sous la direction de gènes homéoboîtes exprimés de façon temporo-spatiale et qui jouent un rôle central dans la formation du squelette(123).

Le maxillaire et la mandibule peuvent être divisés en deux parties : les processus alvéolaires qui contiennent les dents et le corps qui n'entrent pas en jeu dans le maintien des dents (124).

L'os alvéolaire possède une origine ecto-mésenchymateuse et se développe au dépend d'une gouttière maxillaire basale autour du germe en formation.

Le processus alvéolaire est une unité fonctionnelle que l'on peut diviser en plusieurs compartiments. La fine lamelle sur laquelle viennent s'insérer les fibres de Sharpey et qui tapisse l'alvéole dentaire est appelée os alvéolaire. Ensuite, on trouve une partie externe plus épaisse constituée d'os spongieux entre les corticales linguale et labiale qui circonscrit le tout. L'os alvéolaire est constitué de plusieurs couches d'os déposées successivement parallèlement à l'alvéole dentaire et dans lesquelles viennent s'insérer perpendiculairement les fibres de Sharpey (125). Enfin, comme Schroeder l'a montré, étant donné que cet os se développe et se remodèle au moment de la formation et de l'éruption dentaire, on peut dire que cette structure est odonto-dépendante. Sa morphologie dépend donc de la taille, la forme, de la localisation et de la fonction de la dent (124) (figures 17 et 18).

L'os alvéolaire est formé au cours du développement radiculaire à partir d'ostéoblastes du follicule fibreux. Son développement est indépendant des autres parties du processus alvéolaire mais est intimement lié au développement du système d'attache parodontal. Il sera ensuite remodelé au cours de l'éruption dentaire et du remplacement des dents de lait par les dents définitives (125).

Outre son rôle dans l'absorption et la transmission des forces occlusales, son rôle le plus important reste celui d'ancrage de la dent dans l'alvéole notamment grâce aux fibres de Sharpey (124).

2.4- Le desmodonte ou ligament parodontal:

C'est un tissu conjonctif hautement spécialisé, vascularisé et servant de réceptacle aux cellules souches. Il relie les racines dentaires à la paroi de l'os alvéolaire. Il est unique parmi les autres systèmes ligamentaires et tendineux du corps humain car c'est le seul à relier deux tissus durs : l'os alvéolaire et le ciment (126).

Le développement du ligament débute au moment de l'édification radiculaire et avant l'éruption dentaire (figures 16-19). Le ligament parodontal possède un réservoir de cellules souches qui peuvent se différencier en ostéoblastes, cémentoblastes ou fibroblastes (124). Au cours de l'édification radiculaire, les cellules du follicule vont se différencier en cémentoblastes qui forment le premier ciment en regard de la dentine radiculaire et en fibroblastes, responsables de la formation du ligament (125). Les trousseaux de fibres vont prendre naissance à la surface de la dentine radiculaire nouvellement formée et vont être incluses dans le premier ciment, le ciment cellulaire à fibres extrinsèques. Au cours du développement radiculaire et de l'éruption, les fibres vont s'étendre à travers le ligament et former les trousseaux de fibres principales et relier le ciment à l'os alvéolaire.

Les fibres intrinsèques ou matricielles sont des fibres collagéniques orientées parallèlement à la surface radiculaire. Elles sont élaborées par les cémentoblastes et s'entremêlent aux fibres de Sharpey (127). Elles participent au volume tissulaire et à la distribution des forces mécaniques.

Les fibres extrinsèques ou fibres de Sharpey représentent les terminaisons des fibres principales du desmodonte. Elles sont incluses dans le ciment et s'y insèrent perpendiculairement à sa surface (figure 18 B). Ces fibres sont élaborées par les fibroblastes du desmodonte. Du côté du ciment elles sont moins nombreuses, plus fines et moins espacées que du côté osseux (128). Le nombre et la taille des faisceaux peuvent varier en fonction de la situation fonctionnelle et du type de dent. Au niveau du ciment fibrillaire la majorité des fibres sont extrinsèques. Ces fibres sont complètement minéralisées et indiscernables des fibres matricielles. Au niveau du ciment cellulaire, les fibres sont moins nombreuses et minéralisées uniquement à leur périphérie.

Au départ les fibres du desmodonte vont être orientées presque parallèlement à la surface radiculaire. Puis l'orientation va varier au cours de l'édification radiculaire et de la mise sur l'arcade de la dent.

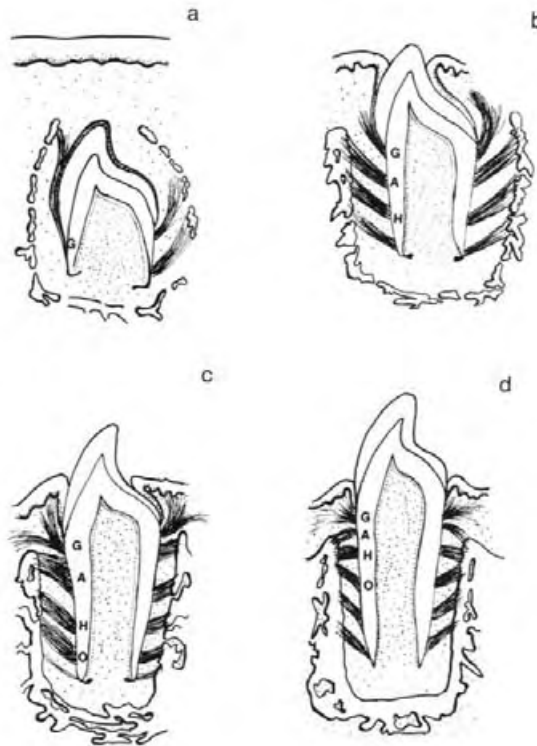


Fig. 23 : Représentation schématique de l'organisation séquentielle des fibres du ligament parodontal (a → d). **G** : fibres gingivo-dentaires et transeptales ; **A** : fibres alvéolaires crestales ; **H** : fibres horizontales ; **O** : fibres obliques (125).

Les fibres se forment et se déposent de façon séquentielle de la jonction amélo-cémentaire à l'apex de la dent. Les premières fibres apposées vont devenir les fibres gingivo-dentaires et transeptales. Les fibres gingivo-dentaires vont prendre une direction occlusale et se terminer dans le tissu conjonctif gingival. Les fibres transeptales vont s'orienter obliquement à partir de la surface radiculaire, passer par-dessus la crête alvéolaire et venir s'insérer sur la racine de la dent adjacente (figure 24). Dans un premier tiers cervical de la racine de la dent en éruption, les fibres vont s'orienter de façon oblique en direction occlusale à partir du cément et venir s'insérer sur l'os alvéolaire. Les fibres du tiers moyen vont s'individualiser même si l'on n'observe pas de connexion directe entre celles provenant de l'os alvéolaire et celles originaires de la surface cémentaire. Dans la portion apicale l'arrangement fibreux est encore peu développé et est similaire à celui retrouvé sur une dent en phase pré-éruptive, parallèle au grand axe de la dent.

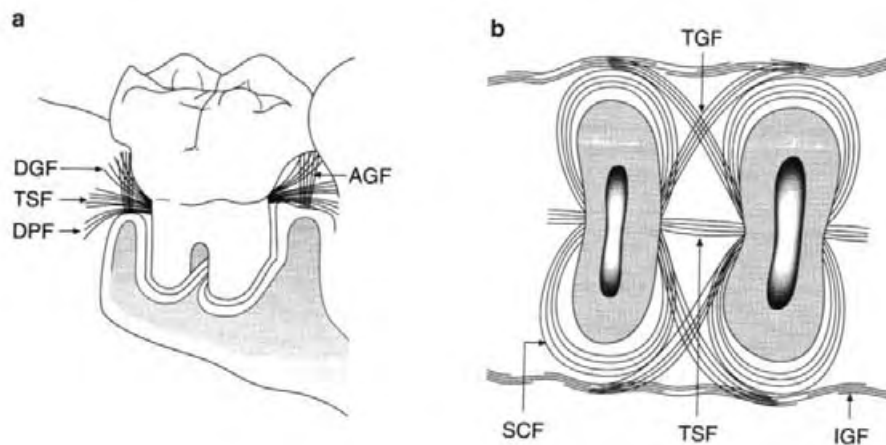


Fig. 24 : (a) Représentation schématique des fibres dento-gingivales (**DGF**), transeptales (**TSF**), dento-périostées (**DPF**) et alvéolo-gingivales (**AGF**). (b) fibres transgingivales (**TGF**), semi-circulaires (**SCF**), transeptales (**TSF**) et intergingivales (**IGF**) (125).

Ce n'est qu'une fois que la dent est fonctionnelle sur l'arcade que les fibres adoptent leur orientation finale (figures 23 d et 24). Les fibres gingivo-dentaires, transeptales et crestales partent de la jonction amélo-cémentaire (figure 24). Les fibres du premier tiers radiculaire se sont horizontalisées, celles du tiers moyen sont obliques en direction occlusale à partir du cément alors que celles du tiers apical prennent une direction oblique à partir du cément et s'insèrent apicalement sur l'os alvéolaire (125) (figure 23 d).

2.5- Le parodonte superficiel ou gencive (figure 25) :

Les tissus gingivaux sont composés d'un épithélium superficiel d'origine ectodermique et d'un tissu conjonctif sous-jacent d'origine mésodermique. Ces deux entités ont des composants qui dérivent à la fois de la muqueuse buccale et du germe dentaire en développement (129).

Etant donné leurs localisations anatomiques différentes, les différents composants de l'épithélium gingival proviennent de régions différentes de la muqueuse orale et du germe dentaire en cours de développement. L'épithélium jonctionnel non kératinisé provient de l'organe de l'émail, tandis que l'épithélium sulculaire non kératinisé et l'épithélium gingival kératinisé sont issus de la muqueuse orale (129). Le tissu conjonctif gingival est un tissu conjonctif très fibreux dont les composants sont directement originaires des tissus conjonctifs de la muqueuse buccale avec certaines fibres comme les fibres dento-gingivales qui proviennent, elles, du follicule dentaire en cours de développement (125) (figure 24).

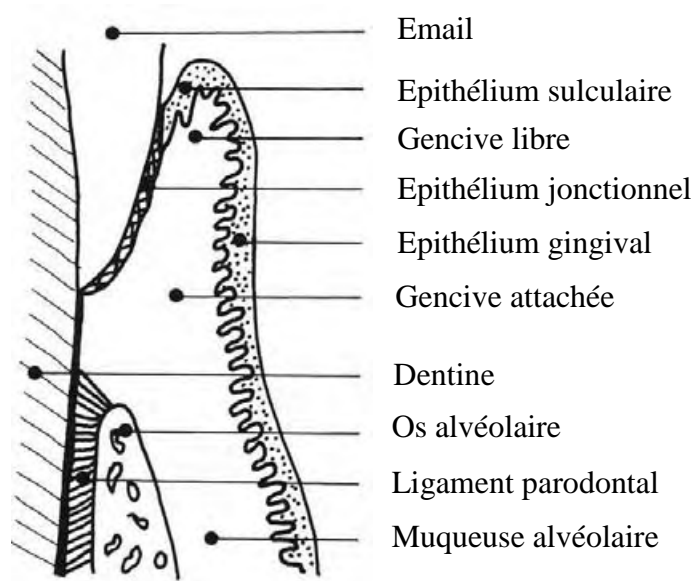


Fig. 25 : Représentation schématique de l'architecture de la gencive saine(125).

3- Facteurs de croissance et de signalisation :

De nombreux facteurs de croissance et de différenciation ont été mis en évidence au niveau des structures parodontales en formation et sont disponibles sur le site internet d'Irma Thesleff : <http://bite-it.helsinki.fi>.

Le TGF- β 1 et ses récepteurs, par exemple, ont été identifiés dans les cémentoblastes, les fibroblastes du ligament et les ostéoblastes alvéolaires pendant la formation du parodonte (130, 131). Shh est retrouvé dans la GEH (85). Le FGF-2, l'EGF, l'IGF et l'IGF-R ainsi que l'hormone de croissance sont également détectés dans les tissus parodontaux (132-135). Nous pouvons constater que ces facteurs sont aussi impliqués dans le développement osseux.

Les BMP sont largement impliquées dans le développement dentaire. Elles sont synthétisées par les améloblastes et odontoblastes différenciés et jouent un rôle important à l'initiation du développement dentaire et dans les différents stades du développement coronaire (136). BMP-2, -4 et -7 sont capables de différencier les cellules pulpaires en odontoblastes et ont été proposés comme acteurs potentiels de la régénération pulpaire (137).

En ce qui concerne la cémentogenèse, et ce malgré des controverses concernant l'expression des BMP-2, -3, -4 et -7 dans les différentes structures parodontales, celles-ci joueraient un rôle essentiel dans les interactions épithélio-mésenchymateuses entre la GEH et le mésenchyme et la différenciation des cellules folliculaires en cémentoblastes (108, 117,

135, 138-140). Il est intéressant de noter que des régénérations cémentaires ont été obtenues chez le singe grâce à l'utilisation de BMP-7 recombinante (139). De la même façon la souris transgénique surexprimant Noggin (inhibiteur des BMP) présente des anomalies amélaire mais également une altération de la morphologie radiculaire (99).

La BMP-3 est détectée dans l'os alvéolaire, le ciment et le ligament parodontal (135, 140). Elle possède un rôle de régulation négative sur la différenciation et la synthèse de matrice calcaire des ostéoblastes stimulés par des BMP ostéogènes comme la BMP-2 et pourrait agir de la même façon sur les cémentoblastes (141).

La BMP-4 est localisée dans le mésenchyme papillaire bordant la GEH et pourrait jouer un rôle précoce dans le développement radiculaire puisqu'elle entraîne également l'expression de Msx-2 dont l'inactivation se traduit chez la souris par des anomalies radiculaires (135).

Ces différentes données ont conduit aux travaux préliminaires exposés dans la partie expérimentale de ce manuscrit (1, 2) et qui peuvent être résumés par le schéma ci-dessous (figure 26).

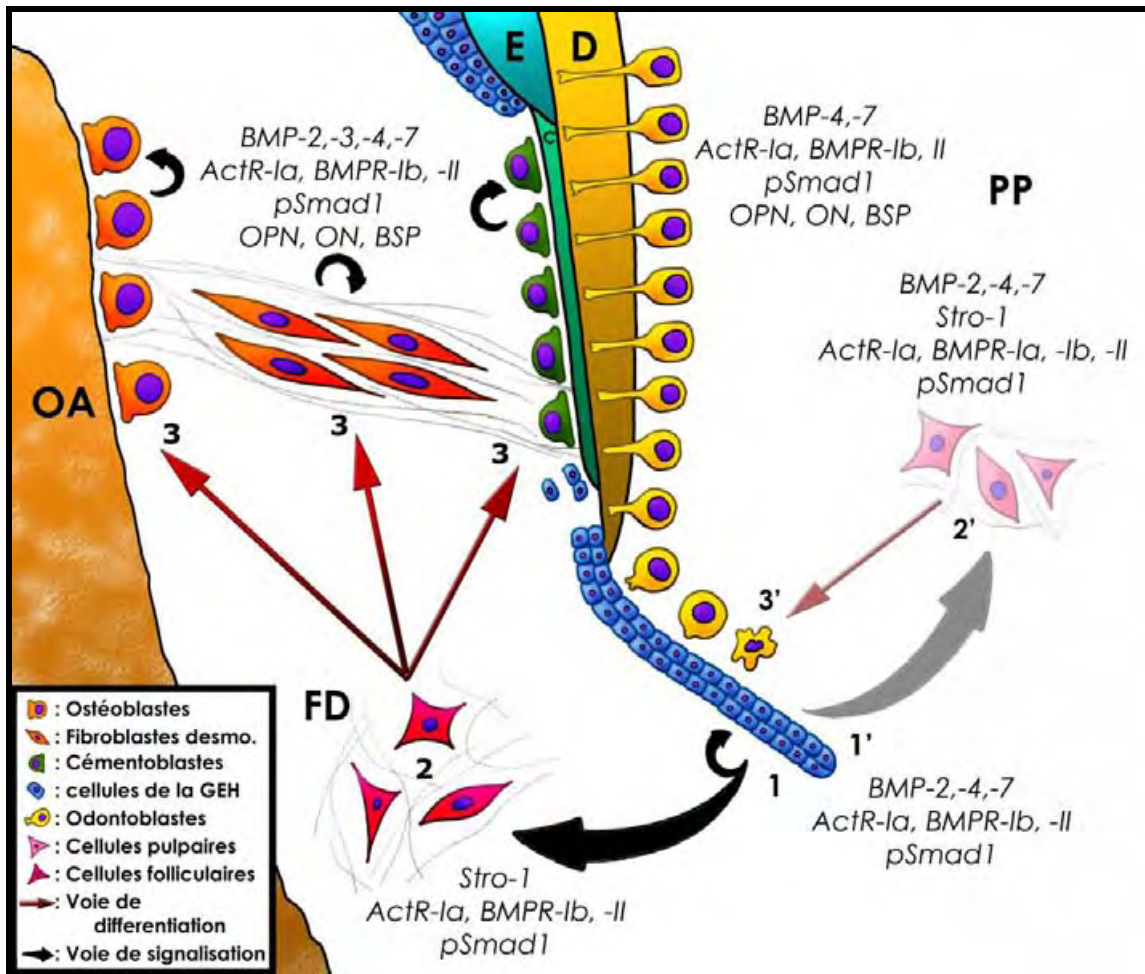


Fig. 26 : Schéma récapitulatif de l'implication des BMP dans le développement radiculaire

Enfin, certaines études récentes ont montré qu'un autre facteur, le LPA, pourrait jouer un rôle dans le développement dentaire et parodontal (142-144). Il agirait sur certains progéniteurs odontoblastiques retrouvés dans la pulpe (145). Il pourrait donc agir sur les progéniteurs parodontaux retrouvés dans le follicule fibreux. Son implication potentielle dans le développement radiculaire dentaire est exposée dans la partie expérimentale.

L'acide lysophosphatidique (LPA)

L'acide lysophosphatidique (LPA) est le plus simple phospholipide retrouvé dans la nature et a longtemps été considéré seulement comme un intermédiaire transitoire dans la synthèse de novo des glycérophospholipides. Cependant un certain nombre d'études qui ont débuté dans les années 1960 décrivent différentes activités biologiques liées au LPA telles que la contraction des cellules musculaires lisses, des effets vaso-actifs ou l'agrégation plaquettaire.

Aujourd'hui, le LPA est considéré comme un phospholipide endogène bioactif. Il possède toutes les propriétés d'un facteur de croissance et joue notamment un rôle dans la prolifération cellulaire, la migration et l'apoptose (146-149).

1- Formule chimique :

L'acide lysophosphatidique (LPA ; 1- ou 2-acyl-*sn*-glycérol-3-phosphate) est un phospholipide constitué d'un squelette glycérol-phosphate sur lequel est greffé un acide gras, en position 1 ou 2, par l'intermédiaire d'une liaison acyl, alkyl ou alkényl. Chez les mammifères, les espèces majoritaires de LPA retrouvées dans les liquides biologiques sont constituées d'acides gras à longue chaîne saturée (C18:0 ; 16:0) ou insaturée (C18:1 ; C20:4). Ces espèces majoritaires présentent généralement l'activité biologique la plus forte (149) (figure 27).

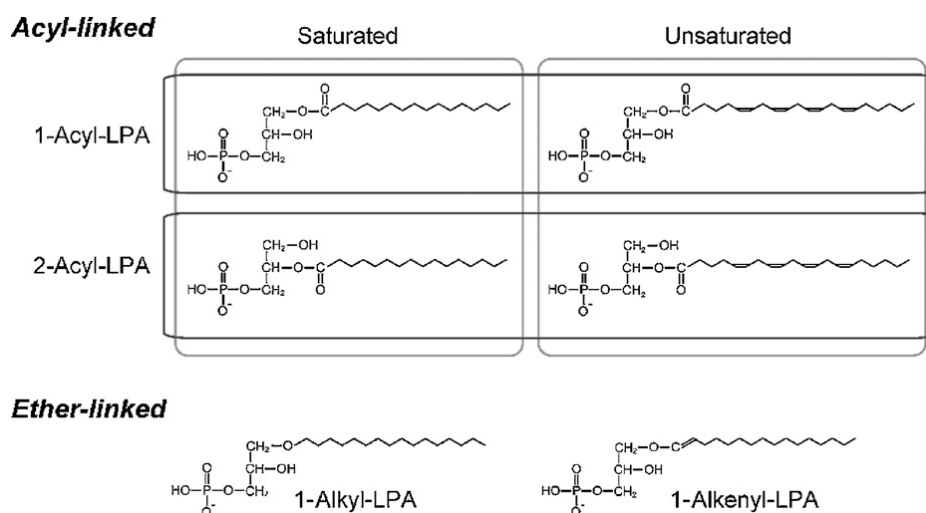


Fig. 27 : Différentes espèces de LPA (150).

2- Localisation du LPA

Le LPA est présent dans plusieurs liquides biologiques où il est maintenu en solution grâce à sa liaison avec l'albumine qui lui sert de véhicule. Il est présent dans les plaquettes sanguines : le sérum obtenu après agrégation plaquettaire contient de fortes concentrations de LPA (2 à 20 μ M). Chez les patients atteints de cancer, il est présent dans les ascites et est également retrouvé dans le liquide folliculaire associé aux lipoprotéines ainsi que dans le milieu interstitiel du tissu adipeux sous-cutané humain avec comme origine cellulaire les adipocytes (151). Enfin, le LPA est également retrouvé dans l'humeur aqueuse et le liquide lacrymal après blessure de la cornée ainsi que dans la salive (152) et le cerveau (153).

3- Métabolisme du LPA :

La présence de LPA dans les milieux biologiques extracellulaires ne peut résulter que d'un transfert actif ou d'une synthèse directement dans le milieu extracellulaire. Il existe des protéines de liaison du LPA (albumine, protéines de liaison des acides gras, gelsoline), mais aucun transporteur transmembranaire n'a été mis en évidence. (154, 155)

Deux voies de synthèse majeures peuvent être considérées. Historiquement, la première voie mettait en jeu l'association de PLC (phospholipase C) et PLA2 (phospholipase A2). Le diacylglycérol produit sous l'effet d'une PLC et rephosphorylé peut être transformé en LPA sous l'effet d'une PLA1 ou d'une PLA2. Ces mécanismes largement étudiés dans le laboratoire sont discutés dans une revue, notamment concernant la production de LPA par les plaquettes (146). L'action massive d'une PLC peut produire des quantités importantes de LPA (156). Ultérieurement, l'hypothèse de production importante de LPA a été envisagée lors de l'action de PLA2 sécrétoire (sPLA2) extracellulaire dans des conditions d'exposition des phospholipides anioniques par le mécanisme du *flip-flop* (diffusion des phospholipides d'une couche à l'autre de la membrane cellulaire) (157) (figure 29).

En effet, les sPLA2 (phospholipases A2 sécrétées) sont de petites phospholipases qui catalysent l'hydrolyse des glycérophospholipides en produisant des acides gras et des lysophospholipides. En utilisant l'acide phosphatidique (PA) comme substrat l'activité PLA2 conduit à la production de LPA. Or, dans les conditions normales, l'acide phosphatidique est peu abondant et se trouve majoritairement au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique (149). Cependant, l'importante quantité de LPA produite par les plaquettes et retrouvé dans le sérum dans certaines conditions inflammatoires (146) a conduit vers l'hypothèse que certaines cellules dont les plaquettes mais aussi les érythrocytes pouvaient subir de profonds remaniements appelés *flip flop* rendant le PA accessible aux sPLA2.

Ce mécanisme de production important, quantitativement, pourrait être envisagé en dehors des plaquettes, en particulier lorsque des cellules en apoptose subissent le phénomène de *flip flop* (5, 6).

Un second mécanisme plus récemment identifié paraît prédominant dans beaucoup de contextes paracrines en particulier dans l'adipocyte ou dans les tumeurs (4, 158-161). Il met en jeu un type particulier de PLD (phospholipases D) active sur les lysophospholipides en particulier la lysophosphatidylcholine (LPC). Cette enzyme porte le nom d'autotaxine (ATX). A titre d'exemple, dans le plasma, la LPC est produite par une LCAT (lecithincholesterol acyltransferase) et des enzymes de type PLA1. Ces LPL sont ensuite transformés par l'activité PLD de l'ATX en LPA (149, 162). L'autotaxine est une ecto-nucléotide pyrophosphatase phosphodiesterase de type II. La glycoprotéine transmembranaire va subir un clivage protéolytique au niveau de son extrémité amino-terminale libérant une protéine soluble qui va pouvoir hydrolyser des phospholipides comme le LPC, associés à la membrane ou à des transporteurs, générant ainsi le LPA (figure 28) (149, 163, 164). ATX est fortement exprimé dans les tumeurs et stimulerait la migration de cellules tumorales (165). ATX est aussi responsable de l'activité lysoPLD des adipocytes et exercerait un contrôle paracrine LPA dépendant de la croissance des préadipocytes (5, 151, 159, 166).

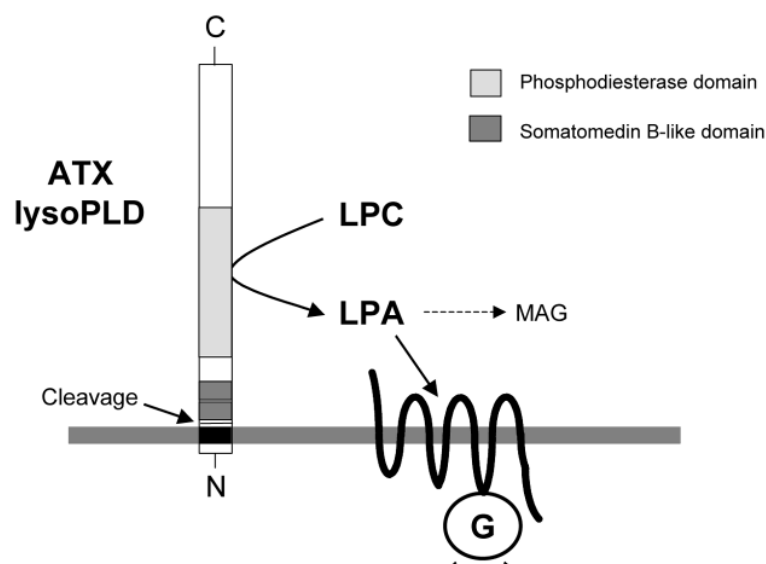


Fig. 28 : Production de LPA par la voie de l'autotaxine/lysoPLD. L'ATX/LysoPLD est clivée libérant une exo-enzyme soluble qui va hydrolyser des phospholipides comme la PLC générant ainsi du LPA (163).

Si le rôle de l'ATX paraît présent dans beaucoup de contextes paracrines impliquant le LPA comme médiateur diffusible, les autres modes de production cellulaire peuvent être

importants dans des systèmes biologiques particuliers. Au niveau de l'os, le LPA produit par les plaquettes et/ou les cellules tumorales par la voie de l'autotaxine stimulerait l'ostéoclasie (167). Cependant, un mécanisme de production par l'ostéoblaste lui-même mettant en jeu une PLA2 et très certainement une PLD a été identifié (5, 6). Dans le laboratoire, nous avons pu documenter une production de LPA par les cellules souches mésenchymateuses en milieu ostéogénique. Lors de l'apoptose massive des ostéoblastes en différenciation terminale, du fait de la présence de PLA2 extracellulaire au niveau de la matrice osseuse, une production mettant en jeu le phénomène de *flip flop* n'est pas à exclure. Ces données sont importantes car elles peuvent conditionner les concentrations potentielles de LPA dans les milieux biologiques et l'activation sélective de certains de ses récepteurs.

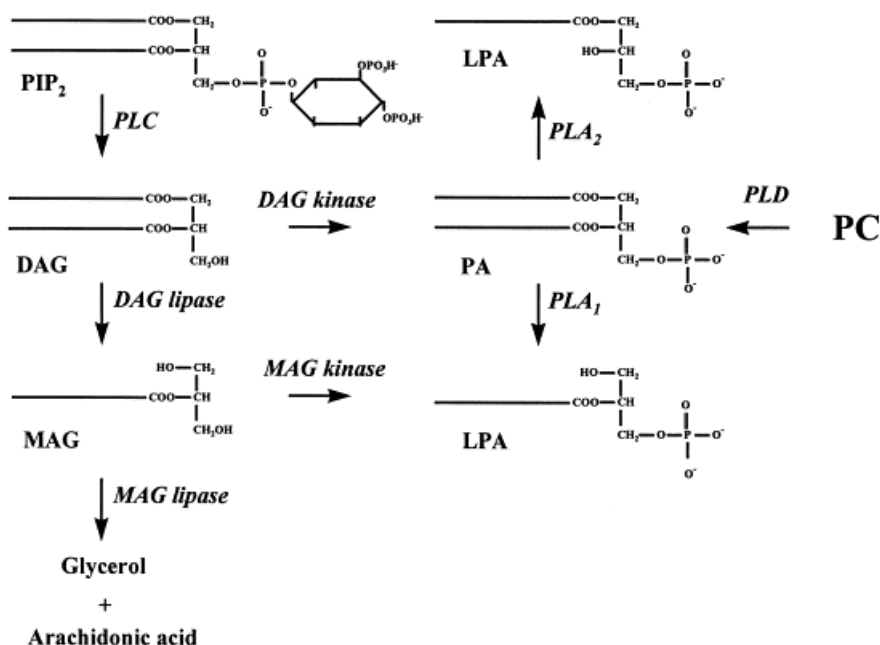


Fig. 29: Voies possibles de production du LPA dans les plaquettes actives (146).

Enfin, parallèlement à sa synthèse, le LPA subit un catabolisme important. Plus de 90% de son hydrolyse correspond à sa déphosphorylation par des lipides phosphate phosphohydrolases (LPP). Ce sont des phosphatases dont le site catalytique est orienté vers la face externe de la membrane plasmique, d'après Brindley *et al.*, 2002 et Simon *et al.*, 2002 (168, 169).

Ces récepteurs ont la capacité d'activer plusieurs voies de signalisation afin de mobiliser le calcium intracellulaire, d'inhiber l'adénylate-cyclase et d'activer la voie des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) par des voie sensibles à la pertussis toxine ($G_{i/o}$) et insensibles ($G_{q/11}$ et $G_{12/13}$) (172) (figure 31).

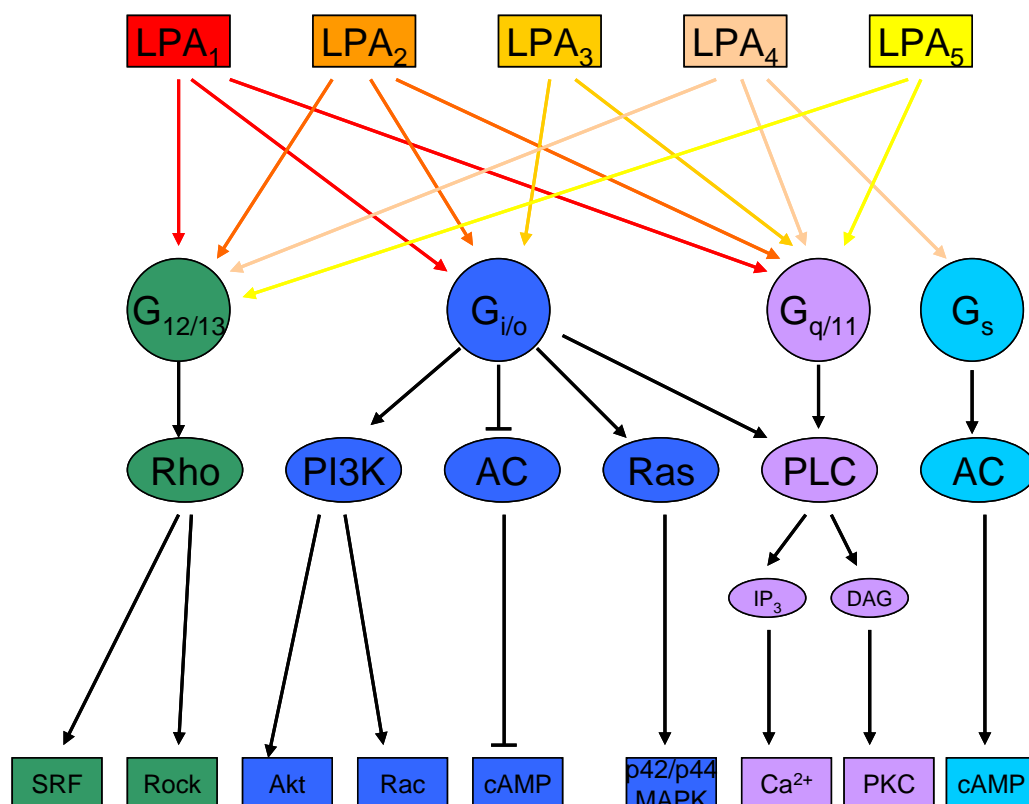


Fig. 31: Voies de signalisation générales impliquant le LPA. Interaction des récepteurs du LPA avec les différentes familles de protéines G et les effets en aval sur les seconds messagers, d'après Ishii *et al.*, 2009, Nogushi *et al.*, 2009 et Ankiler et Chun, 2004. AC, adénylate cyclase; cAMP, cyclic adénosine monophosphate; DAG, diacylglycérol ; p42/p44 MAPK, p42/p44 mitogen-activated protein kinase; IP₃, inositol 1,4,5-triphosphate; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKC, protéine kinase C; PLC, phospholipase C; Rock, Rho-associated kinase; SRF, serum response factor (150, 170, 173).

4.1- LPA₁

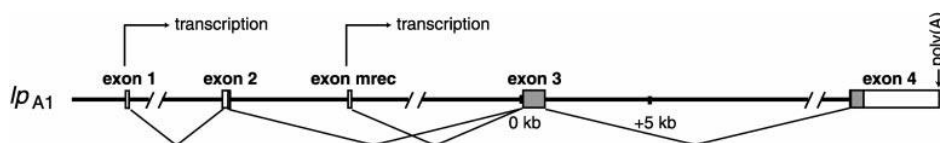


Fig. 32 : Structure du gène du LPA₁

Il présente une expression ubiquitaire dans de nombreux organes tels que le cerveau, le cœur, les poumons, l'estomac, l'intestin grêle, la rate, le thymus, les testicules et les muscles squelettiques des souris adultes mais pas dans le foie (172). Chez l'homme il est retrouvé dans le cerveau, le cœur, le placenta, la rate, les reins, le colon, l'intestin grêle, la prostate, les testicules, les ovaires, le pancréas, les muscles squelettiques et peu ou pas dans le thymus, le foie les poumons ou les leucocytes du sang périphérique (172, 174). Le LPA₁ est localisé sur le chromosome 9 chez l'homme et 4 chez la souris.

L'activation du LPA₁ entraîne des réponses cellulaires variées telles que la prolifération, la survie cellulaire (inhibition de l'apoptose), l'activation des MAPK et du SRE (*Serum Response Element*), l'inhibition de l'adényl cyclase, l'activation des PLC (phospholipase C) et PKC (Protéines Kinases C), l'activation de Rho et Akt (172). D'autres réponses comme la formation de fibres de stress, la rétraction des neurites, l'augmentation de calcium intracellulaire, l'incorporation de BrdU, le relargage d'acide arachidonique et la production d'Inositol-phosphate (IP) sont aussi décrits (150, 170, 172, 174-176).

Ces réponses se font par l'intermédiaire de 3 voies de signalisation principales en aval des GCPR qui sont G_{i/o}, G_{q/11} et G_{12/13} (172) (figure 33).

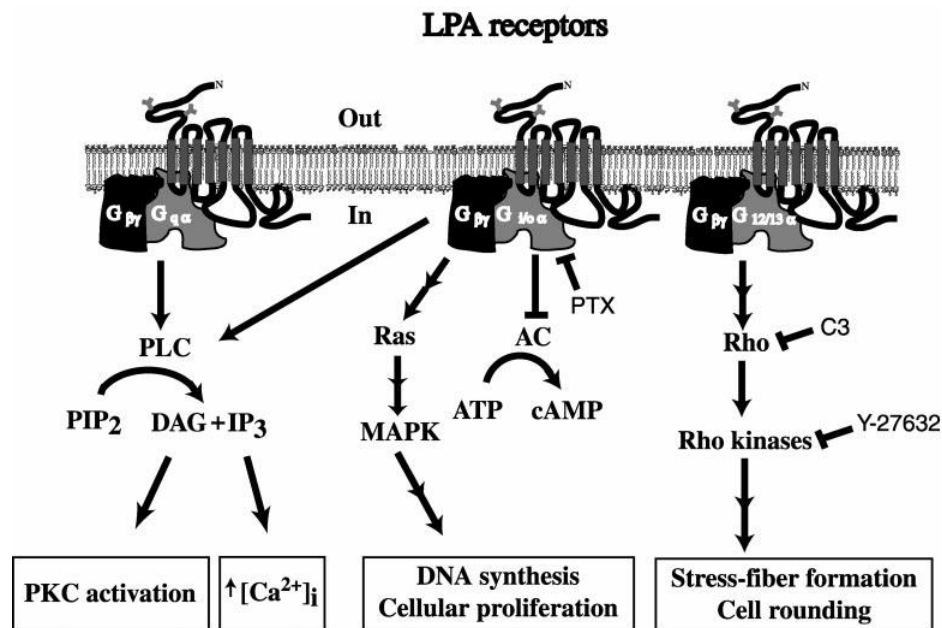


Fig. 33 : Principales voies de signalisation en aval de LPA₁(7)

La souris invalidée pour le gène du LPA₁ (délétion de l'exon 3) présente une mortalité néo-natale de 50% (7), un réflexe de succion altéré, un retard de croissance post-natal, un dysmorphisme cranio-facial (museau raccourci et yeux plus espacés), ainsi qu'une augmentation de l'apoptose des cellules de Schwann au niveau du nerf sciatique (172, 173), une résistance à la douleur (177), un phénotype proche de pathologies psychiatriques telles que la schizophrénie (178, 179), une diminution de la fibrose pulmonaire et rénale (180, 181).

4.2- LPA₂

Le gène du second récepteur du LPA, le LPA₂ aussi appelé EDG-4 a été découvert grâce à des moteurs de recherche comme GeneBank qui ont révélé une autre GCRP présentant une homologie de séquence de 60% de ses acides aminés avec le LPA₁ (182, 183). Le gène est localisé sur le chromosome 19 chez l'homme et 8 chez la souris. Il est composé de 3 exons et d'un intron inséré dans le domaine transmembranaire VI comme pour le LPA₁ suggérant une origine ancestrale commune de ces 2 gènes (152, 172).

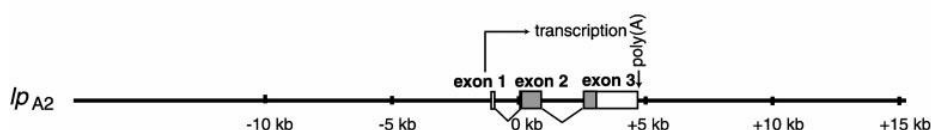


Fig. 34 : Structure du gène du LPA₂

Le récepteur LPA₂ est exprimé chez la souris abondamment au niveau du cerveau (pendant la vie embryonnaire), au niveau des testicules, des reins mais aussi dans les poumons, le cœur, la rate, l'estomac, le thymus et le cerveau adulte. Il est peu ou pas exprimé dans d'autres organes tels que le foie, l'intestin grêle et les muscles squelettiques (172, 184). Chez l'homme, il est essentiellement localisé dans les testicules et les leucocytes du sang périphérique, un peu moins dans le pancréas, la rate, le thymus et la prostate (183) et présente peu ou pas d'expression dans le cœur, le cerveau, le placenta, les poumons, le foie, les muscles squelettiques, les ovaires, les reins, l'intestin grêle et le colon (172, 174, 184).

L'activation du récepteur 2 du LPA entraîne des réponses cellulaires similaires à celles retrouvées lors de l'activation du LPA₁ telles que la rétraction neuronale, l'inhibition de l'adényl cyclase, l'activation du SRE, l'augmentation de calcium intracellulaire, la production d'inositol phosphate, l'activation des MAPK, l'inhibition de l'apoptose et le relargage d'acide arachidonique et l'« arrondissement » cellulaire. De la même façon que pour le LPA₁, le signal LPA₂ passe par G_{i/o}, G_{q/11} et G_{12/13} (150, 170, 172, 184).

Les souris invalidées pour le récepteur 2 du LPA par délétion de l'exon 2 contenant potentiellement les domaines transmembranaires I à IV (184) naissent avec une fréquence normale. Elles ne possèdent aucune anomalie phénotypique notable, cependant, l'activation de la PLC et la mobilisation du calcium sont nettement diminuées dans les cellules MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*) de ces souris (184). La double invalidation LPA₁/LPA₂ n'apporte pas d'anomalies phénotypiques supplémentaires par rapport à la souris LPA₁^(-/-) à part une augmentation de la fréquence d'hématomes frontaux périnataux (184). Il semblerait qu'il y ai des fonctions redondantes comme l'activation de PLC, la mobilisation du calcium, la prolifération, l'activation d'Akt et JNK ainsi que la formation de fibres de stress (174, 184).

4.3- LPA₃

L'existence d'un troisième récepteur du LPA a été suggérée car certaines études montraient que certaines cellules sensibles au LPA ne possédaient ni le récepteur 1 ni le récepteur 2. Le LPA₃ (ou EGD-7) a donc été cloné par RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) avec des primers dégradés et une recherche d'homologie de séquence (185). Le gène du LPA₃ présente environ 50% de codons identiques avec LPA₁ et LPA₂ et code pour une protéine de 353 acides aminés. Ce gène présente aussi la particularité d'avoir un intron dans le domaine transmembranaire VI. Il est localisé sur le chromosome 1 chez l'homme et 3 chez la souris (152, 172, 174) .

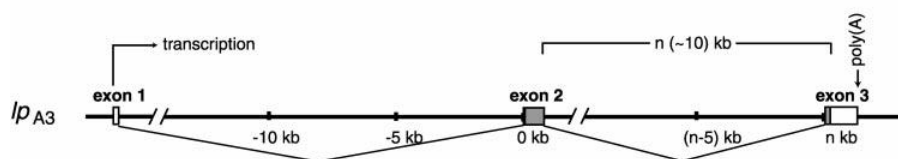


Fig. 35 : Structure du gène du LPA₃

Comme pour le LPA₂, le LPA₃ murin est abondamment retrouvé dans les testicules, les reins, les poumons. Il est plus modérément exprimé dans le cœur, l'estomac, la rate et le cerveau adulte et « périnatal », le placenta, l'utérus et les ovaires des souris adultes. Par contre, il est peu ou pas présent dans le cerveau embryonnaire, le foie et le thymus (152, 172, 174). Le LPA₃ humain lui est surtout exprimé dans la prostate, les testicules, le pancréas et le cœur, moins dans les poumons, les ovaires et dans le cerveau et n'est pas retrouvé dans le placenta, le foie, les muscles squelettiques, les reins, la rate, le thymus, l'intestin grêle, le colon ou les leucocytes du sang périphérique (152, 155, 172, 174, 185).

Contrairement au LPA₁ et LPA₂, le LPA₃ se lie avec les protéines G_{i/o}, G_{q/11} mais pas G_{12/13} entraînant l'activation de la PLC, la mobilisation du calcium intracellulaire, l'inhibition ou l'activation de l'adényl-cyclase et l'activation des MAPK ainsi que la production d'inositol phosphate, le relargage d'acide arachidonique et l'élongation neuronale (150, 170, 174, 186).

Les souris LPA₃^(-/-) ont été créées par délétion d'un fragment contenant une région non traduite et le codon start de l'exon 2. Les souris LPA₃^(-/-) naissent avec une fréquence normale, cependant les femelles LPA₃^(-/-) montrent une implantation embryonnaire retardée, un espacement embryonnaire altéré, une hypertrophie placentaire et une diminution de taille des portées (174, 187). Les prostaglandine E et I (PGE et PGI) générées par la cyclooxygénase-2 (COX-2) sont connues pour jouer un rôle essentiel dans l'implantation embryonnaire. Les souris LPA₃^(-/-) présentent des niveaux d'ARNm de COX-2 considérablement diminués et donc des niveaux de PGE et PGI diminués (174, 187).

4.4- LPA₄

Le récepteur 4 du LPA, LPA₄ ou GPR23 ou P2Y9 a été cloné chez l'homme et possède 20 à 24% d'homologie d'acides aminés avec le LPA₁, LPA₂ ou LPA₃. Le LPA₄ est

philogénétiquement éloigné des récepteurs 1, 2 ou 3 du LPA et appartient à la famille des récepteurs non-EDG. Il est plus proche d'un récepteur nucléotidique de la famille de GCRP P2Y (155, 188). Il est localisé sur le chromosome X chez l'Homme et la souris.

Dans l'espèce humaine il semble relativement peu exprimé quel que soit l'organe examiné sauf au niveau des ovaires. (155, 188). Chez la souris, le LPA₄ est retrouvé dans l'utérus et le placenta. Il jouerait un rôle dans la reproduction à la fois chez l'Homme et chez la souris (150). Par ailleurs, la gestation augmente l'expression des ARNm du LPA₄ dans l'utérus mais pas dans les ovaires. En milieu de gestation, la quantité d'ARNm du LPA₄ est supérieure dans l'embryon par rapport au placenta et à l'utérus. Le LPA₄ jouerait un rôle important dans le développement de nombreux organes dont le cerveau. En effet, l'expression de l'ARNm du LPA₄ a été observée dans des cellules souches embryonnaires humaines indifférenciées et en voie de différenciation neuronale (150). Chez la souris le LPA₄ a aussi été détecté dans les neurones et les astrocytes. Il semblerait qu'il soit impliqué dans des processus de développement neuronaux (150). Enfin, le LPA₄ serait aussi présent dans les plaquettes et agirait comme inhibiteur de l'agrégation plaquettaire liée au LPA (189).

La signalisation par le LPA₄ semble passer par les voies G_s, G_{q/11} et G_{12/13} entraînant une augmentation du calcium, la stimulation de l'adényl cyclase, l'activation de zif268, la rétraction neuronale, l'agrégation cellulaire, la formation de fibres de stress (150, 170, 188, 190).

La souris LPA₄^(-/-) présente une augmentation de la migration des fibroblastes embryonnaires stimulés par le LPA (150, 191).

4.5- LPA₅

Le récepteur 5 du LPA, LPA₅ ou GPR92 ou GPR93 est un récepteur couplé aux protéines G orphelin présentant 24% d'homologie de séquence d'acides aminés avec le LPA₄. Il appartient à la famille des récepteurs non-EDG et est localisé sur le chromosome 12 chez l'homme et 6 chez la souris.

Le LPA₅ serait présent chez la souris dans les ganglions de la racine dorsale et jouerait un rôle dans la modulation de la douleur et la réponse nociceptive. Présent dans les plaquettes, il serait impliqué dans le changement de forme (150).

L'activation du LPA₅ passerait par les protéines G_{q/11} et G_{12/13} et entraînerait la formation de fibres de stress, l'augmentation de calcium, la stimulation de l'adényl-cyclase, la production d'inositol phosphate, la rétraction neuronale et l'arrondissement cellulaire (150, 170).

Il n'existe pas de données concernant la souris LPA₅^(-/-).

4.6- P2Y₅

Le récepteur 6 du LPA, P2Y₅ ou LPA₆ a été décrit initialement en 1996 comme étant une GPCR encodée dans un intron du gène du rétinoblastome. En analysant les cellules B103 et RH7777 humaines exprimant P2Y₅, les auteurs ont remarqué qu'elles répondaient à une stimulation par le LPA (192). Ce récepteur est présent sur le chromosome 13 chez l'homme et 14 chez la souris (170).

L'activité du LPA₆ passerait par les protéines G_{12/13} et peut-être G_s et G_i et aurait comme conséquences l'activation de CRE (*cyclic AMP response element*), la rétraction neuronale, le « blebbing » membranaire. Il jouerait ainsi un rôle dans la croissance des cheveux en régulant le développement du follicule pileux (150, 170) et probablement dans la perméabilité vasculaire (150).

Il n'existe pas de données concernant la souris LPA₆^(-/-).

4.7- P2Y₁₀

Ce récepteur a été décrit récemment et appartient aussi à la famille des récepteurs non-EDG. Il est localisé sur le chromosome X chez l'homme et chez la souris dans lequel se situe LPA₄ (170, 193). Il présente peu d'homologie avec les récepteurs EDG par contre, il présente 34% d'homologie avec le récepteur LPA₄, 35% avec le LPA₅ et 31% avec GPR87 (193). Une autre particularité de ce récepteur c'est qu'il lie à la fois le LPA et la sphingosine 1 phosphate (S1P) (193).

Chez la souris, il est retrouvé au niveau de l'utérus, de la prostate, du cerveau, des poumons et dans les muscles squelettiques mais pas dans les testicules, le foie ou les reins et peu dans le placenta. Il serait aussi retrouvé dans les plaquettes et les lymphocytes B. Son rôle est peu connu, il répond à la stimulation par le LPA en mobilisant le calcium intracellulaire (170, 193).

4.8- GPR87

Ce récepteur appartient aussi à la famille des récepteurs dits non-EDG et est localisé sur le chromosome 3 (3q25) chez l'homme et la souris et est codé par deux exons ce qui le différencie de la plus part des autres récepteurs P2Y (170, 194). Il ne présente pas d'homologie avec les récepteurs LPA₁₋₃, par contre il possède 27% et 25% d'homologie respectivement avec le LPA₄ et LPA₅ (194).

Chez la souris, le gène du GPR87 est exprimé de façon importante dans les testicules et le cerveau, beaucoup moins dans le placenta, les ovaires, la prostate et les muscles squelettiques et est absent du cœur, des poumons, des reins, du foie ou de l'intestin (194).

Son activation par le LPA entraînerait une mobilisation du calcium intracellulaire (170, 194).

Son rôle n'est pas encore connu, mais compte tenu de sa présence dans les ovaires et le placenta, il pourrait jouer un rôle dans le développement ovarien et le cancer (194).

5- Physiopathologie du LPA

5.1- LPA et système vasculaire

Présent dans le sérum, le LPA stimule la prolifération, la migration, la synthèse d'ADN et la survie de nombreux types cellulaires (195, 196).

Contos et al., ont montré que l'inactivation du LPA₁ et du LPA₂ entraînait l'apparition d'hématomes frontaux périnataux (7, 184) suggérant un rôle important du LPA dans le développement du réseau vasculaire (195).

Le LPA relargué par les plaquettes en réponse à une lésion vasculaire et en agissant par les voies G_{i/o}, G_{q/11} et G_{12/13}, augmente la contraction, des cellules musculaires lisses des vaisseaux en modulant le calcium intracellulaire (149, 195, 197, 198). Il agit aussi sur la prolifération, la migration et la cohésion des cellules endothéliales suggérant une participation dans la ré-endothélialisation et le maintien de l'intégrité vasculaire (195, 199). Les LPAs insaturés peuvent entraîner la dédifférenciation des cellules musculaires lisses en cellules d'aspect fibroblastique ayant perdu leur potentiel de contraction (197). Il peut aussi augmenter la perméabilité de cellules endothéliales de cerveau en culture en association avec la formation de fibres de stress. Par ailleurs, le LPA put inhiber la perméabilité d'autres cellules endothéliales (aortes bovines) et produire des effets opposés sur la vascularisation. Ces différences sont vraisemblablement liées à une différence d'expression des récepteurs au LPA (195).

Le LPA augmente l'expression de gène pro-angiogéniques tels que le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et le MIF (*Macrophage migration Inhibitory Factor*) (195). Le LPA possède aussi des propriétés angiogéniques indirectes par la sécrétion par des cellules cancéreuses mammaires de GM-CSF, Gro-alpha, MCP-1 et IL6 qui sont des facteurs favorisant l'ostéoclasie par les cellules cancéreuses mammaires (158). Il est intéressant de noter que le VEGF est un facteur essentiel dans la différenciation de progéniteurs ostéoblastiques (200, 201).

Le LPA est aussi retrouvé en abondance dans le corps lipidique des lésions athéroscléreuses probablement en raison de la captation des LDL (*Low Density Lipoproteins*) oxydées. En présence de LPA, les cellules endothéliales en culture ont une augmentation d'expression des protéines d'adhérence des monocytes (ϵ -sélectine et V-CAM), participant aux processus inflammatoires associés à l'athérosclérose (149). Le LPA stimule également la migration, la prolifération, la mobilisation calcique et la dédifférenciation des cellules musculaires lisses favorisant leur infiltration dans l'intima des vaisseaux entraînant la progression de l'athérosclérose. Enfin, il augmente la production de certaines métalloprotéases par les lymphocytes, ce qui pourrait entraîner une fragilisation de la matrice de collagène et contribuer au phénomène de la rupture de la plaque d'athérome (149, 195, 202).

Une autre action spécifique du LPA est la modification de la prolifération des cellules mésangiales ce qui influencerait les processus physiopathologiques impliqués dans la glomérulosclérose rénale (180, 203).

5.2- LPA et cicatrisation


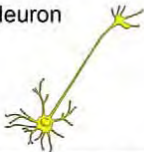
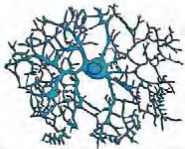
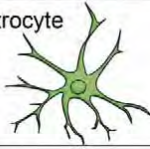

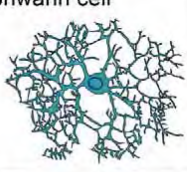
Le LPA pourrait participer à la cicatrisation de certains tissus comme la cornée (204), l'épithélium gastrique ou la peau. Balasz et al. ont montré que l'application topique de LPA sur une plaie chez le rat augmentait l'épaisseur de la couche épithéliale néoformée et accélérerait la fermeture de la plaie (149). Le LPA est aussi produit par l'activité lysoPLD de l'autotaxine dans le liquide des ampoules lors de blessures cutanées et agirait via son récepteur LPA₁ dans la cicatrisation cutanée en activant la migration des kératinocytes. L'augmentation de l'expression de l'autotaxine au niveau des ampoules cutanées et son implication dans la production de LPA représenteraient une cible thérapeutique intéressante dans la cicatrisation cutanée (205).

5.3- LPA et système nerveux.

De fortes concentrations de LPA sont retrouvées dans le cerveau provenant de l'activité liée à l'autotaxine et aux neurones corticaux post-mitotiques capables de synthétiser et sécréter du LPA. Par ailleurs, le cerveau et le système nerveux sont enrichis en récepteurs du LPA suggérant un rôle important du LPA dans le développement du système nerveux et du cerveau. Le LPA jouerait un rôle dans la neurogenèse, la migration neuronale, l'extension axonale et la myélinisation. En effet, la souris LPA₁^(-/-) en plus d'un dysmorphisme craniofacial présente une anomalie de la succion qui serait liée à des modifications de leur bulbe olfactif et de leur cortex cérébral (7, 195). De plus, malgré l'absence de défaut observés dans

le système nerveux périphérique et central, les souris $LPA_1^{-/-}$ présentent une augmentation de l'apoptose des cellules de Schwann du nerf sciatique (7, 173) (figure 36).

Enfin, de façon intéressante, ces souris $LPA_1^{-/-}$ possèdent un comportement proche de celui retrouvé dans les pathologies psychiatriques notamment la schizophrénie (178).

Cell Types	Reported LPA Receptor Expression	Responses to LPA
 NPC	LPA_1, LPA_2	Proliferation Differentiation Inhibition of differentiation (in pathological concentration) Neurite retraction / cell rounding Early conductance change
 Neuron	LPA_2	Neurite retraction / cell rounding Growth cone collapse / repulsive turning Inhibition of migration Survival Apoptosis
 Oligodendrocyte	LPA_1	Process formation (maturation) Process retraction / cell rounding
 Astrocyte	LPA_{1-5}	Proliferation Impaired glutamate uptake ROS production Cytoskeletal changes Neuronal differentiation factor release
 Microglia	LPA_1, LPA_3	Metabolic activity increase (proliferation) Chemokinesis enhancement
 Schwann cell	LPA_1, LPA_2	Survival Differentiation Cytoskeletal changes Demyelination

Current Opinion in Pharmacology

Fig. 36 : LPA et cellules nerveuses(170)

Des études récentes ont montré que la signalisation par le LPA intervient précocement après lésion nerveuse et suggèrent qu'une intervention au niveau des récepteurs du LPA pourrait diminuer sa progression et/ou sa sévérité (197). En activant le LPA_1 , le LPA stimule directement les nocicepteurs périphériques via $G_{i/o}$ et libère la substance P pro-nociceptive (197). Par ailleurs, les souris $LPA_1^{-/-}$ sont résistantes aux douleurs neuropathiques produites par ligation partielle du nerf sciatique. Cela pourrait être en relation avec la démyélinisation

observée chez ces souris. Enfin, lorsque l'intégrité vasculaire est interrompue, il y a une augmentation de LPA au niveau interstitiel affectant à la fois les fonctions neuronales et gliales. L'identification de l'implication du LPA et de la voie de signalisation LPA₁-Rho-ROCK comme initiateurs de la douleur neuropathique suggère que le LPA pourrait être une cible pharmaceutique dans le traitement de ces douleurs (174, 197).

5.4- LPA et système reproducteur

Le LPA est présent en forte concentration dans le liquide folliculaire au stade pré-ovulatoire et sa concentration plasmatique augmente au cours de la grossesse (206). Le LPA₄ est largement retrouvé dans les ovaires chez l'homme et la souris suggérant un rôle important et multiple du LPA dans la fonction ovarienne. Le LPA induit l'expression des cytokines angiogéniques que sont les interleukines 6 et 8 (IL-6, IL-8) au niveau des cellules lutéiniques de la granulosa chez les femmes en cours de fécondation *in vitro*. Le LPA₁ jouerait un rôle dans l'expression d'IL-8 et le LPA₂ dans celle d'IL-6 (207). La surexpression par le LPA de ces cytokines pro-angiogéniques pourrait entraîner un syndrome d'hyperstimulation ovarienne compliquant certains traitements d'infertilité et ayant des effets secondaires tels que la nausée et la sensation de ballonnements (207).

Des études sur les souris LPA₁₋₃^(-/-) ont montré que le LPA ne jouait pas un rôle crucial dans l'ovulation. Son importance dans l'ovulation chez l'homme reste encore à déterminer.

Le LPA₃ est exprimé dans les trompes utérines, le placenta et l'utérus mais pas dans les ovaires, ovocytes et embryons jusqu'au stade de blastocyte. Les souris LPA₃^(-/-) présentent des retards d'implantation embryonnaire liés au taux maternel d'expression du LPA (197, 207). À côté de ces résultats observés chez l'animal, des études récentes semblent indiquer que le LPA₃ jouerait un rôle dans la reproduction chez l'homme en activant la paroi utérine pendant la phase d'implantation embryonnaire augmentant ainsi le taux de fertilité (197, 207).

En pathologie, les gènes du LPA₂ et LPA₃ ont été retrouvés dans les placentas de patients présentant de l'hypertension gestationnelle et de la pré-éclampsie. Le LPA pourrait aussi être impliqué dans les cancers de l'endomètre par l'implication de LPA₂ et de MMP7 (matrix metallo protease 7) (207). Les récepteurs LPA₁₋₃ et LPA₁₋₄ sont présents respectivement chez la souris et l'homme. La délétion d'un de ces récepteurs chez la souris entraîne une diminution de l'accouplement et une augmentation de la prévalence d'azoospermie chez les souris âgées ainsi que d'une augmentation de l'apoptose des cellules germinales (207). Dans les cancers ovariens, les niveaux d'expression du LPA et sa régulation par les différents récepteurs semblent jouer un rôle important. LPA₂ et LPA₃ mais pas LPA₁

sont surexprimés dans les tissus cancéreux ovariens et LPA₂ est surexprimé dans le carcinome des glandes mammaires (207). D'autres facteurs comme la glycodeline, le TRIP6 (*thyroid receptor-interacting protein 6*), la télomérase, Fas, IL6, IL8, COX-2, GRO α (*growth regulated oncogene α*) et l'uPA (*urokinase plasminogen activator*) semblent moduler la signalisation du LPA dans les cancers ovariens (207). Les récepteurs LPA₁₋₃ sont plus exprimés dans les tumeurs malignes de la prostate que dans les bénignes (207). Le LPA₁ pourrait aussi agir par l'intermédiaire de facteurs secondaires comme des cytokines, CYR61 et la protéine de signalisation RhoA (207).

Le LPA, entraînant la prolifération et la migration de cellules cancéreuse ovariennes et du sein, pourrait servir de marqueur biologique dans le dépistage et l'évaluation de la progression de ce type de cancer (197, 207). Si les taux de LPA sérique sont élevés dans plus de 90% de patients atteints de cancers ovariens au stade I et II, ce pourcentage pourrait être surestimé à cause de l'activation plaquettaire lors de la préparation des échantillons de sérum et de plasma (197).

5.5- LPA et obésité

Valet et al., ont montré que le LPA est libéré *in vitro* par les adipocytes et est présent *in vivo* dans le milieu extra-cellulaire du tissu sous-cutané adipeux humain (151). De plus, le LPA, par son récepteur LPA₁, augmente la prolifération des préadipocytes en culture (149). Enfin, l'autotaxine, responsable de la sécrétion de LPA est fortement augmentée chez les souris *db/db* génétiquement obèses (208). Il pourrait donc influencer le recrutement de nouveaux adipocytes au sein du tissu adipeux au cours de la mise en place de l'obésité (149).

5.6- LPA et cancer

L'initiation, la progression et les métastases de cancers, mettent en jeu des processus compétitifs et séquentiels dont la prolifération et la croissance cellulaire, la survie et l'anti-apoptose, la migration cellulaire, l'infiltration tissulaire et/ou des organes par les cellules cancéreuses et la néo-angiogenèse.

Le LPA₁ est présent dans de nombreuses tumeurs humaines dont le poumon, le sein, l'os, l'estomac, le rein, la prostate et les ovaires (167, 179). Certaines études ont d'ailleurs montré que l'inhibiteur des récepteurs LPA₁ et LPA₃, le Ki16425, bloque la migration des cellules cancéreuses pancréatiques et diminue la formation d'ascite et de métastases osseuses chez la souris (3, 4, 179, 197).

En raison de ces effets mitogéniques, le LPA jouerait un rôle dans le développement et la progression de différents types de cancers. En augmentant la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, le LPA pourrait favoriser les processus de néo-angiogenèse nécessaires à la survie et à l'expansion de certains cancers. Il stimule aussi la production de métalloprotéases et favorise la migration cellulaire favorable au développement de métastases (149, 179, 195, 197, 207). C'est aussi un agent anti-apoptotique *in vitro* et *in vivo* sur les cellules normales et cancéreuses exposées à la cisplatine ou à des irradiations (209).

Le LPA pourrait servir lors du dépistage des cancers ou de cible pharmaceutique afin de limiter la progression de ceux-ci (160).

5.7- LPA et différenciation ostéo-chondrocytaire

Le LPA jouerait un rôle dans la régulation des chondrocytes. Kim et al. ont montré que le LPA régule la prolifération de chondrocytes de rat suggérant son rôle dans la modulation de l'arthrose. Les chondrocytes primaires de rat expriment le LPA₁ et LPA₃ mais pas LPA₂. Le LPA serait de ce fait une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de l'arthrose (210). D'autres équipes ont montré un effet anti-prolifératif sur des chondrocytes immortalisés humains (211).

Le LPA agirait en potentialisant l'effet de la 24R,25(OH)₂D₃ sur les chondrocytes de la zone restante en augmentant la maturation, la production matricielle et la survie cellulaire (212).

Par ailleurs, Grey et al. ont montré pour la première fois que le LPA jouait un rôle dans la prolifération de cellules ostéoblastiques de rat par la mise en jeu de la voie de signalisation G_i avec activation des PI3K et qu'il était aussi anti-apoptotique pour ces mêmes cellules ainsi que des cellules d'ostéosarcome (SaOS) (213, 214). De plus, dans les cellules ostéoblastiques MC3T3-E1, le LPA entraîne des modifications du cytosquelette et stimule la migration cellulaire (215). Les phospholipides pourraient être impliqués dans le devenir des ostéoblastes *in vivo* et le développement squelettique.

Les cellules ostéoblastiques humaines ainsi que les cellules G292 et MG63 possèdent les récepteurs LPA₁ et LPA₂ (216). Le LPA₄ serait aussi un récepteur spécifique de l'os. En effet, les souris invalidées pour le LPA₄ présentent une augmentation de volume osseux, de nombre et d'épaisseur de travées. Le LPA₄ jouerait plutôt un rôle dans l'inhibition de la formation osseuse (217).

Le LPA associé à la vitamine D₃ jouerait aussi un rôle dans la maturation d'ostéoblastes humains comme le montre une augmentation de l'activité de la phosphatase

alcaline et l'expression de l'ostéocalcine. Cet effet du LPA passerait par la voie des MAPK (Mitogen activated protein kinase) (218).

Le LPA est aussi responsable du « blebbing » membranaire des ostéoblastes de souris et la formation de dendrites sur les cellules de type ostéocytaires MLO-Y4 (6, 219). Il jouerait un rôle dans la reformation de la connectivité mécanosensorielle des ostéocytes pendant la cicatrisation de fractures (219). Les stimuli mécaniques libérant de l'ATP qui agirait par les récepteurs P2X7 sur les ostéoblastes entraîneraient la production de prostaglandines et de LPA. Ces médiateurs lipidiques agiraient en retour de façon autocrine ou paracrine afin de favoriser la formation osseuse (5, 6) (figure 37).

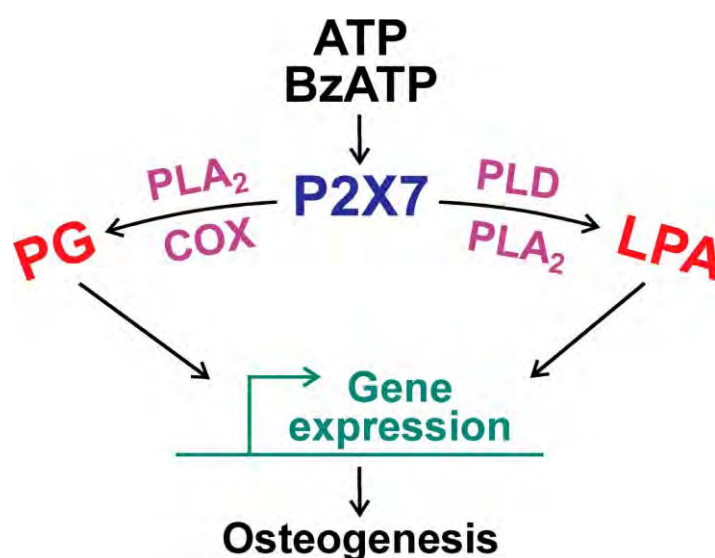


Fig. 37 : Voie de signalisation mettant en jeu P2X7-LPA (5).

Enfin le LPA stimule la production par les ostéoblastes humains d'interleukines IL-6 et IL-8 qui jouent un rôle dans l'ostéoclasie (220). Le LPA dérivé des plaquettes ainsi que du LPA purifié stimuleraient la sécrétion de ces cytokines par les cellules cancéreuses de cancer du sein MDA-BO2. Par ailleurs, la production d'IL-6 et IL-8 augmenterait lorsque les cellules tumorales surexpriment le LPA₁. Le LPA stimulerait donc indirectement la résorption osseuse ostéoclastique (3). Le LPA₁ exprimé par les cellules tumorales est essentiel à la progression métastatique osseuse et le blocage de ce récepteur par des antagonistes du LPA tels que Ki16425 pourrait être une cible thérapeutique intéressante dans le traitement des métastases osseuses (4). Le LPA produit par les plaquettes et par la voie de l'autotaxine agirait directement sur les ostéoblastes pour stimuler leur migration et leur prolifération et sur les précurseurs ostéoclastiques pour stimuler l'ostéoclasie (167) (figure 38).

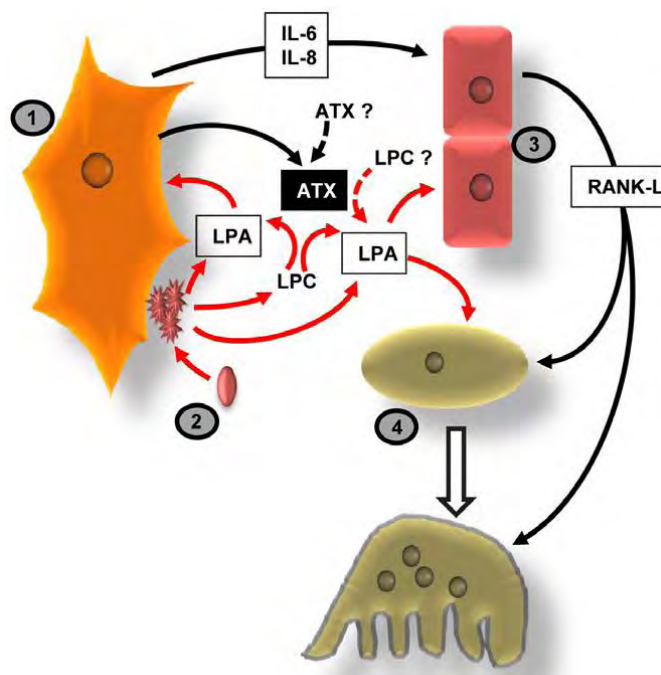


Fig. 38 : Représentation schématique des effets de LPA/autotaxine sur la progression de métastases osseuse ostéolytiques (167)

Une étude a montré qu'au cours de l'embryogenèse, chez la souris, l'ATX est d'abord exprimé dans le mésenchyme puis progressivement dans les os longs. Cette expression va diminuer pour se restreindre en fin d'embryogenèse aux os du crâne, aux côtes, sternum, processus xiphoïde et au niveau des futures zones articulaires au niveau des membres. Comme nous le verrons dans la partie expérimentale, ce sont des zones qui sont altérées par l'inactivation du LPA₁. Au même stade dans le développement dentaire l'ATX est présent au niveau de la partie interne de l'épithélium adamantin interne et dans les cellules mésenchymateuses adjacentes à la papille dentaire (59).

5.8- LPA et développement dentaire

Le LPA est présent dans la salive à une concentration de 0.785 nmol/mL. De plus, il aurait une action mitogénique, de chimiotactisme et d'élévation du calcium intra-cellulaire sur les cellules fibroblastiques gingivales et du ligament parodontal. De ce fait, il pourrait jouer un rôle intéressant dans la cicatrisation (143, 144).

Cerutis et al ont montré que le LPA et PDGF sont co-libérés par les plaquettes du caillot. Ils agiraient sur les fibroblastes et joueraient un rôle dans la cicatrisation et la régénération parodontale (142).

Par ailleurs, les cellules pulpaire dentaires contiennent une proportion de cellules qui peuvent répondre à une stimulation par le LPA. Il diminuerait la différenciation de ces progéniteurs en cellules de type odontoblastique même en présence de BMP-7 (145). LPA et ROCK (*Rho associated kinase*) joueraient un rôle déterminant dans la migration des cellules pulpaire dentaires (221).

L'hypothèse à l'origine de ce travail s'est basée sur les travaux préliminaires effectués concernant la différenciation de cellules ostéo-cémento-progénitrices, que sont les cellules folliculaires, par les BMPs et la relation que pouvait avoir le LPA avec les BMPs dans la régulation de l'ostéogenèse et de la cémentogenèse.

Pour cela j'ai commencé par préciser les effets du LPA₁ chez la souris LPA₁^(-/-). Je me suis consacrée à la fois à l'étude du phénotype d'un point de vu osseux et dentaire et à la différenciation des cellules mésenchymateuses de ces souris (mBMSC: *murine Bone Marrow Stromal Cells*) vers le phénotype ostéo-cémentoblastique indépendamment de son rôle possible dans la résorption osseuse et l'ostéoclasie.

Les résultats de ces travaux sont exposés dans le second chapitre.

CHAPITRE II :

Partie Expérimentale

1- Travaux préliminaires : Implication des BMPs et de leurs récepteurs dans le développement parodontal et la différenciation des cellules folliculaires dentaires. (voir annexes)

Kemoun P, Laurencin-Dalicieux S, Rue J, Vaysse F, Romeas A, Arzate H, Conte-Auriol F, Farges JC, Salles JP, Brunel G. **Localization of STRO-1, BMP-2/-3/-7, BMP receptors and phosphorylated Smad-1 during the formation of mouse periodontium.** Tissue Cell 12007;39: 257-66.

Kemoun P, Laurencin-Dalicieux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-Auriol F, Briand-Mesange F, Gadelorge M, Arzate H, Narayanan AS, Brunel G, Salles JP. **Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro.** Cell Tissue Res 2007;329: 283-94.

A partir d'un modèle d'étude du développement parodontal qu'est l'étude de la première molaire mandibulaire de la souris, nous avons dans un premier temps réalisé la localisation des BMP-2, -3, et -7 ainsi que de leurs récepteurs et de STRO-1, un antigène de surface des cellules mésenchymateuses pluripotentes, à J6, 13 et 23 du développement parodontal ainsi que dans des cellules folliculaires de souris immortalisées.

Les résultats ont montré que les cellules folliculaires pluripotentes car positives pour STRO-1 peuvent être la cible potentielle des BMP sécrétés par la GEH car possédant leurs récepteurs. La BMP-3 bloquerait la signalisation des BMP-2 et -7 et le récepteur BMPRIa serait peu impliqué dans le développement parodontal. Enfin, les cellules folliculaires immortalisées de souris seraient capables d'exprimer CP-23, une protéine spécifique du cémentoblaste, lorsqu'elles sont stimulées par les EMD. Elles auraient donc le potentiel de se différencier en cémentoblastes (2).

Nous avons ensuite étudié plus particulièrement la multipotentialité et notamment cémentoblastique des cellules folliculaires humaines. Nous avons montré que des cellules folliculaires humaines provenant de dents de sagesse avaient la capacité de se différencier, en fonction du milieu de culture en ostéoblastes, cémentoblastes, chondrocytes et adipocytes.

Nous avons confirmé que ces cellules possédaient des propriétés similaires aux cellules stromales multipotentes et qu'elles pouvaient être stimulées par les BMP. Nous avons

aussi montré par l'expression de la CAP et de la CP-23 que ces cellules traitées par les EMD pouvaient acquérir un phénotype cémentoblastique. L'effet du gel d'EMD est largement dépendant de la présence des BMP-2 et -7 présents dedans en ce qui concerne la différenciation cémentoblastique même s'il exercerait d'autres effets indépendant des BMP sur ces cellules (1).

Dans ces travaux, j'ai participé à la préparation des tissus, à l'analyse histologique et immunohistochimique ainsi qu'aux techniques de culture et de différenciation cellulaire.

Une autre partie des résultats, non publiés, concernent les cultures de cémentoblastes.

J'ai mis au point, dans le laboratoire, une technique de culture des cémentoblastes humains à partir d'explants d'origine dentaire et comparé le phénotype des cémentoblastes à celui d'ostéoblastes, cultivés *in vitro*. Ces cellules proviennent de dents de sagesse ou de prémolaires extraites pour des raisons orthodontiques et qui n'ont pas achevé leur édification radiculaire (222). Elles sont obtenues par « grattage » ou « *scraping* » graduel de la partie la plus externe de la racine nettoyée préalablement au PBS (figure 39). Le premier produit du *scraping* (reste du ligament parodontal jusqu'à la partie la plus superficielle du cément radiculaire) correspond aux cellules bordant la racine dentaire TRLC (*Tooth Root Lining Cells*). Par *scraping* plus poussé, des copeaux de cément proprement dit, contenant les cémentoblastes, sont récupérés.

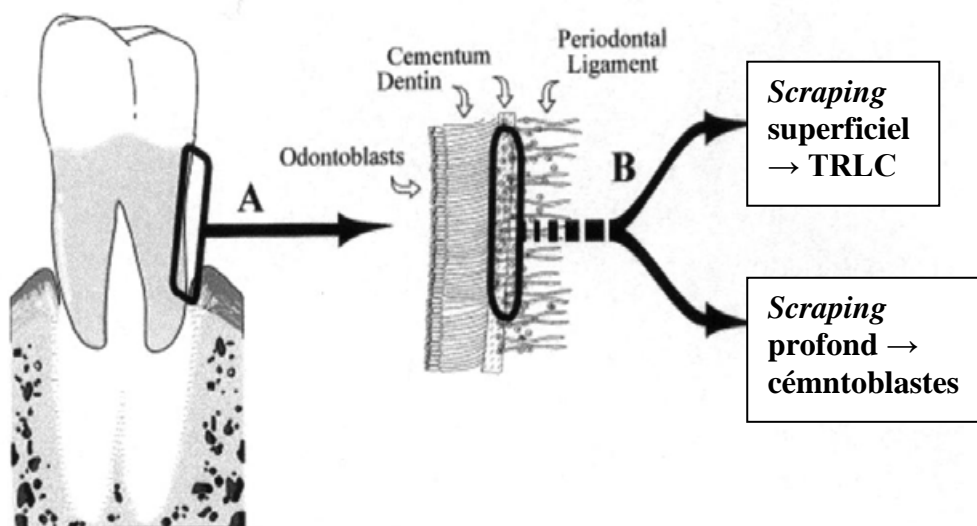


Fig. 39 : Schéma représentant la technique de *scraping* sur une molaire (223).

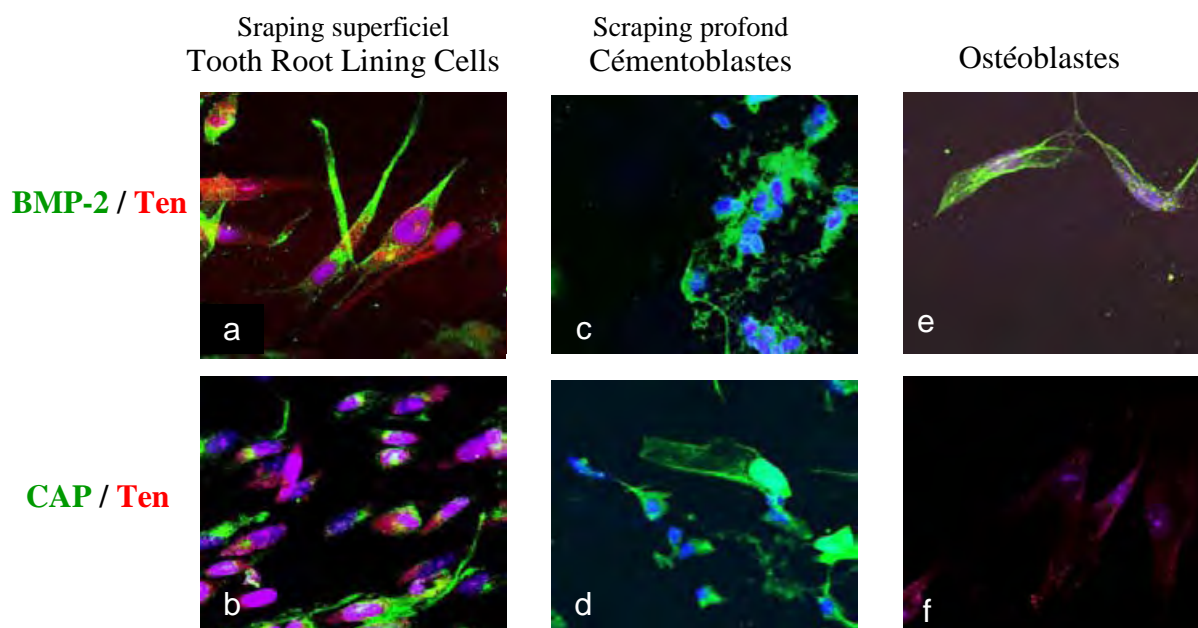


Fig. 40 : Immunofluorescence des cémentoblastes cultivés in vitro L'expression de la BMP-2 (a, c et e), la ténascine X (a, b, c, d, e et f) et la CAP (b, d et f) est étudiée dans des cultures de cémentoblastes (a et b) issus du scraping profond, des TRLC (c et d) issus du scraping superficiel et d'ostéoblastes (e et f). Le marquage pour la BMP-2 et la CAP est vert et celui pour la ténascine-X rouge.

Comme le montre la figure 40 (a, c et e) un marquage cytoplasmique des 3 types cellulaires (TRLC, cellules issues du *scraping* profond (potentiellement des cémentoblastes) et ostéoblastes) est observé pour la **BMP-2**. La BMP-2, protéine impliquée dans la morphogenèse osseuse, est exprimée au cours des différentes étapes du développement dentaire radiculaire (135, 138, 140) et dans les trois compartiments du parodonte : l'os alvéolaire, le ligament parodontal et le ciment. Les résultats montrent un marquage positif cytoplasmique pour la CAP dans certaines TRLC (figure 40 b) et dans la plupart des cellules issues du *scraping* profond potentiellement des cémentoblastes (figure 40 d). Les ostéoblastes sont non réactifs pour ce marqueur (figure 40 f).

La technique par *scraping* de la surface radiculaire ne pouvant exclure la contamination des cémentoblastes potentiels par d'autres populations cellulaires bordant la racine, j'ai tenté d'isoler des populations cellulaires monoclonales par dilutions limites. J'ai pu isoler 9 clones. Le profil d'expression pour différentes protéines importantes dans la caractérisation des cémentoblastes a ensuite été réalisé à partir de lysats cellulaires totaux de ces 9 clones.

Dans un premier temps, j'ai choisi d'étudier la BSP (figure 41 A), OPN (figure 41 B) et la pro-BMP-2 (précurseur intracellulaire de la BMP-2) (figure 41 C), qui sont 3 marqueurs de cellules différenciées ostéoblastiques et cémentoblastiques. La figure 41 montre que pour 5 clones sur les 9 (figure 41 A, B, C pistes 2 à 6), comme dans les ostéoblastes (figure 41 B, C piste 1), nous retrouvons ces 3 marqueurs présents dans les lysats cellulaires totaux. Il faut noter que le marquage détecté pour la proBMP-2 est faible (peu visible sur la figure) mais présent dans les pistes 3, 5 et 6.

Dans un second temps, l'expression de la CAP (figure 41 D) a été étudiée dans les 5 clones précédemment cités. Parmi les 5 clones étudiés, la CAP n'est retrouvée que dans 3 d'entre eux (figure 41 D, pistes 3, 5 et 6). Comme attendu, les ostéoblastes étudiés n'expriment pas la CAP (figure 41 D, piste 1).

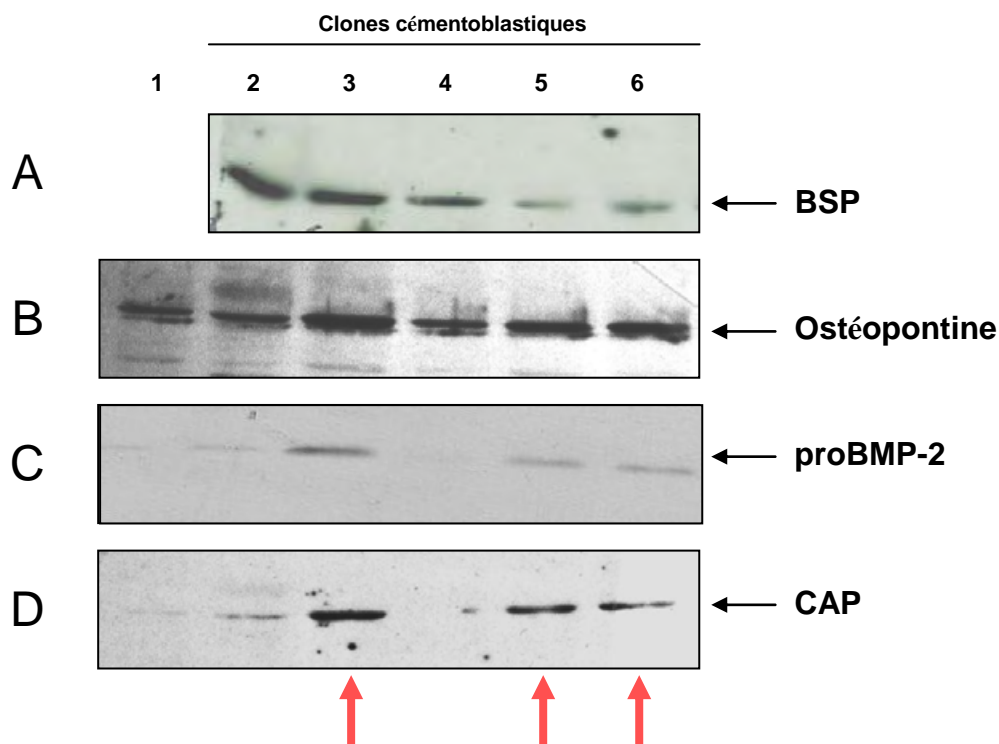


Fig. 41 : Profil d'expression de la BSP, l'ostéopontine, la proBMP-2 et la CAP des clones cémentoblastiques obtenus après *scraping* profond de la racine et dilution limite. 5 clones cellulaires obtenus après dilution limite du *scraping* profond (pistes 2 à 6) sont cultivés et comparé à des ostéoblastes (piste 1) pour l'expression de la BSP (A, 55 kDa), l'ostéopontine (B, 70 kDa), la proBMP-2 (C, 85 kDa) et la CAP (D, 55 kDa). Les clones choisis sont ceux des pistes 3, 5 et 6

Les résultats obtenus à partir de cette technique montrent que certaines cellules issues du *scraping* profond sont positives pour la CAP, et sont donc potentiellement

cémentoblastiques. Cependant, la technique de prélèvement de ces cellules décrite par Grzeźicki WJ. et *coll.*, possède quelques inconvénients (222). Nous ne sommes jamais à l'abri d'une contamination de ces cémentoblastes par des cellules du ligament parodontal. C'est pour cela que nous avons décidé de faire des dilutions limites de cette population cellulaire afin d'obtenir des clones que nous avons sélectionnés en fonction de l'expression de facteurs ostéoblastiques et cémentoblastiques. D'après ces résultats, 15 % des populations cellulaires isolées sont CAP positives et donc potentiellement cémentoblastiques. L'originalité de ce travail réside dans la réalisation des clones de cémentoblastes humains à partir d'explants.

A la suite de ces travaux et de ceux sur les BMPs et les cellules folliculaires qui m'ont permis d'acquérir la base des techniques d'histologie et de culture des cellules souches, j'ai décidé d'étudier un autre facteur, particulièrement étudié dans le laboratoire, qui pourrait être impliqué dans le processus d'ostéogenèse ainsi que dans le développement parodontal et la différenciation des cellules folliculaires dentaires.

Le facteur choisi et étudié est l'acide lysophosphatidique (LPA) et notamment son récepteur le LPA₁.

La première étape a été de mettre en place l'élevage de souris LPA₁^(+/-). Nous avons du les transférer sur un fond génétique différent et établir un nombre de *back-cross* suffisant afin d'obtenir un nouveau fond génétique stable. Je synthétiserai les résultats obtenus sur l'analyse de l'ostéogenèse d'une part, résultats développés dans un article actuellement soumis. Je détaillerai les résultats obtenus sur l'édification radiculaire qui feront l'objet d'une autre publication.

2- Le récepteur 1 de l'acide lysophosphatidique LPA₁ est impliqué dans le développement osseux et l'ostéogenèse

L'identification des mécanismes régulant la croissance squelettique et la formation osseuse présente d'importantes implications en physiopathologie et médecine.

L'acide lysophosphatidique (LPA) est un médiateur lipidique qui agit de façon autocrine et paracrine par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G. Le LPA jouerait un rôle important dans la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire et serait impliqué au cours du développement et dans différents processus physiopathologiques (173, 224-226). Il serait présent dans la circulation à des concentrations nanomolaires voire micromolaire et plusieurs études ont montré que la production locale, paracrine, de LPA par les cellules et tissus contribuerait à leur régulation (146, 157, 159, 166).

Comme nous l'avons vu précédemment, l'interaction LPA-LPA₁ serait aussi impliqué dans la régulation de la différenciation ostéoblastique et la formation osseuse (5, 6, 213, 218, 219, 227, 228). Le LPA entraîne la prolifération d'ostéoblastes de rat par une voie de signalisation impliquant la protéine G_i et le calcium cytosolique ; il inhiberait par cette même voie l'apoptose de ces cellules. Plus récemment, il a été montré que les souris déficientes pour le récepteur LPA₄ présentaient une augmentation de leur masse osseuse (217). Le LPA₄ agirait en augmentant l'AMPc (217). Les souris invalidées pour le récepteur 1 du LPA, LPA₁^(-/-), possèdent des anomalies de succion et neurologiques (173) cependant le rôle du LPA₁ n'a pas été entièrement étudié en ce qui concerne la formation osseuse in vivo.

C'est la raison pour laquelle j'ai étudié le phénotype osseux des souris LPA₁^(-/-). Pour cela, j'ai analysé histologiquement la structure du tissu osseux et du cartilage de croissance de ces animaux. Nous les avons aussi étudiés par microscanner. J'ai étudié la composition des os longs de ces souris par spectroscopie à infra-rouge et RT-PCR quantitative et réalisé de la

culture de cellules mésenchymateuses des souris $LPA_1^{(-/-)}$ afin d'étudier leur potentiel de prolifération et différenciation ostéoblastique.

Ce travail montre que les souris $LPA_1^{(-/-)}$ possèdent des anomalies du développement osseux. Les résultats de μ CT montrent des anomalies à la fois trabéculaire et corticales avec notamment un volume osseux, un nombre et une épaisseur des travées diminués mais aussi une diminution de l'épaisseur corticale. Le processus global de l'ostéogenèse semble altéré en l'absence de LPA_1 .

En plus du nanisme, l'examen du squelette des souris $LPA_1^{(-/-)}$ montre des fusions au niveau des côtes et des anomalies sternales. Des observations similaires sont retrouvées lors d'altérations ou d'absence de facteurs de transcription ou de croissance comme *Hoxa-9*, *Hand-2* et les *BMP4* et *7* (229-231).

En ce qui concerne les résultats de la RT-PCR quantitative sur différents marqueurs de croissance et de différenciation osseuse, seules les transcriptions de l'ostéocalcine et du collagène 1 sont diminuées.

Les résultats de culture cellulaire sur les cellules mésenchymateuses montrent un défaut de prolifération des cellules mésenchymateuses de souris $LPA_1^{(-/-)}$ et un retard dans le processus de minéralisation.

Il semblerait que le LPA_1 influencerait surtout les premiers stades de différenciation ostéoblastique. Et que le défaut de minéralisation observé chez les souris $LPA_1^{(-/-)}$ serait plus lié à de l'ostéopénie vraie qu'un défaut de minéralisation.

En conclusion, le LPA_1 jouerait un rôle dans les processus de modelage et remodelage au cours du développement osseux. L'os pourrait devenir une cible des thérapeutiques impliquant les lysophospholipides et leurs récepteurs.

Title:

Lysophosphatidic acid receptor LPA₁ is involved in bone development and osteogenesis

Original study

Authors' names and affiliations:

Isabelle Gennero^{1,2*}, Sara Laurencin-Dalichieux^{1,4*}, Françoise Conte-Auriol^{1,3}, Fabienne Briand-Mésange¹, Danielle Laurencin⁵, Jackie Rue⁴, Nicolas Beton¹, Nicole Malet¹, Marianne Mus^{1,3}, Akira Tokumura⁶, Philippe Bourin⁷, Laurence Vico⁸, Gérard Brunel⁴, Richard O. C. Oreffo⁹, Jerold Chun¹⁰, and Jean Pierre Salles^{1,3}

¹INSERM Unité 563 (Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan), Université Paul-Sabatier, Hôpital Purpan, CHU de Toulouse 31059 Toulouse cedex 9, France

²Institut Fédératif de Biologie, Laboratoire de Biochimie, CHU de Toulouse 31059 Toulouse cedex 9, France

³Endocrine and Bone Diseases Unit, Hôpital des Enfants, CHU de Toulouse, 31059 Toulouse cedex 9, France

⁴Faculté de Chirurgie Dentaire, Université Paul-Sabatier, 3 Chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse cedex, France

⁵Institut Charles Gerhardt de Montpellier, UMR 5253, CNRS-UM2-ENSCM-UM1, Université Montpellier 2, CC1701, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France

⁶Department of Health Chemistry, Institute of Health Biosciences, University of Tokushima Graduate School, 1-78-1 Shomachi, Tokushima, Japan.

⁷Etablissement Français du Sang Pyrénées-Méditerranée, 75 Rue de Lisieux, 31300 Toulouse, France

⁸Université de Lyon, F42023, Saint-Etienne, France and INSERM U890/IFR143, F42023, Saint-Etienne, France

⁹Bone and Joint Research Group, Centre for Human Development, Stem Cells and Regeneration, Institute of Developmental Sciences, University of Southampton Medical School, Southampton SO16 6YD, UK

¹⁰Department of Molecular Biology, Dorris Neuroscience Center, The Scripps Research Institute, 10550 N. Torrey Pines Rd., ICND-118, La Jolla, CA, USA

* These authors contributed equally to the work.

Funding sources: This work was supported by grants from the French Program of the Hospital Clinical Research (PHRC, AOL 0304602), from the Conseil Régional de Midi-Pyrénées (Cellular and Gene Therapy Program) and from the Etablissement Français du Sang (EFS) (Programm 2003.02). J. Chun was supported by grants from the NIH: MH051699 and NS048478. S. Laurencin-Dalicieux is recipient of a grant provided by Pfizer Co. R. Oreffo is supported by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council. JP Salles is supported by a grant provided by Pfizer Co..

Running title: LPA1 and bone

Author's email addresses:

Isabelle Gennero: gennero.i@chu-toulouse.fr

Sara Laurencin-Dalicieux : laurencins@hotmail.com

Françoise Conte-Auriol : crc@chu-toulouse.fr

Fabienne Briand-Mésange : fbriandm@toulouse.inserm.fr

Danielle Laurencin : danielle.laurencin@univ-montp2.fr

Jackie Rue : rue@cict.fr

Nicolas Beton : nicolas.beton@inserm.fr

Nicole Malet: nicole.malet@inserm.fr

Marianne Mus : mariannemus@hotmail.fr

Akira Tokumura : tokumura@ph.tokushima-u.ac.jp

Philippe Bourin : philippe.bourin@efs.sante.fr

Laurence Vico : vico@univ-st-etienne.fr

Gérard Brunel : brunel@cict.fr

Richard OC Oreffo: roco@soton.ac.uk

Jerold Chun : jehun@scripps.edu

Jean Pierre Salles: jpsalles@toulouse.inserm.fr

Corresponding author:

Prof. Jean Pierre Salles, INSERM Unité 563 (Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan),
Bâtiment C, Hôpital Purpan, 31059 Toulouse cedex 9, France. Tel: +33 (0) 5 62 74 86 66 Fax: +33 (0)
5 62 74 86 50

E-mail: jpsalles@toulouse.inserm.fr

Number of Words:

Abstract: 234

Manuscript: 36634

Number of Figures:

Color : 3

Black/White: 4

Conflict of interest page

All authors have no conflict of interest.

Abstract.

Lysophosphatidic acid (LPA) is a lipid mediator that acts in paracrine and autocrine systems via interaction with a subset of G protein-coupled receptors (GPCRs). LPA promotes cell growth, motility, and differentiation and has been shown to be implicated in a variety of developmental and pathophysiological processes. At least 5 LPA receptor subtypes have been identified to date, LPA₁-LPA₅. Several studies suggest that the local production of LPA by tissues and cells contributes to paracrine regulation. A complex interplay between LPA and its receptors is also believed to be involved in the regulation of osteoblast differentiation and bone formation. The role of the LPA₁ receptor has to date not been extensively examined with regard to bone formation in vivo. We attempted to clarify the role of the LPA₁ receptor in vivo through defining the bone phenotype of LPA₁^(-/-) mice. These mice demonstrated bone defects and low bone mass, highly indicative of an important role played by LPA₁ in osteogenesis. LPA₁^(-/-) mice presented with growth and costal abnormalities, which also highlights specific roles of LPA₁ during bone development. μ CT and histological analysis suggested altered endochondral ossification is. Finally, bone marrow mesenchymal progenitors from LPA₁^(-/-) mice demonstrated a decreased proliferation rate and delayed osteoblastic differentiation process. Taken together these results suggest that LPA₁^(-/-) strongly influences bone development both quantitatively and qualitatively. This may be in a manner that involves paracrine pathways in the growth plate and bone.

Keywords: lysophosphatidic acid, LPA₁, bone, osteoblast, mesenchymal stem cell, osteogenesis

Introduction

Identification of the mechanisms that promote skeletal growth and bone formation has significant implications in pathophysiology and medicine. Setting an adequate bone mass during development is essential for a healthy skeleton and subsequent minimal fracture incidence throughout life. There is increasing evidence that local molecular factors strongly influence the setting of bone mass through induction and regulation of osteoblast proliferation and differentiation. Lysophosphatidic acid (LPA) is a lipid mediator that acts in paracrine and autocrine systems via interaction with a subset of G protein-coupled receptors (GPCRs). LPA promotes cell growth, motility, and differentiation and has been shown to be implicated in a variety of developmental and pathophysiological processes (1-4). At least 5 LPA receptor subtypes have been identified to date, LPA₁-LPA₅, (5,6). Moreover LPA is present in the systemic circulation in nanomolar to micromolar concentrations. Several studies suggest that the local production of LPA by tissues and cells contributes to paracrine regulation (7-10).

A complex interplay between LPA and its receptors is also believed to be involved in the regulation of osteoblast differentiation and bone formation (11-17). Thus LPA induces proliferation of primary rat osteoblasts through a pathway that involves Gi proteins and cytosolic calcium and inhibits apoptosis of primary rat osteoblasts. LPA promotes maturation of the human osteosarcoma cell line MG63 (14) and LPA has been shown to induce membrane blebbing in mouse primary osteoblasts (16) that promotes dendrite outgrowth in osteocyte-like MLO-Y4 cells (17). In MC3T3-E1 osteoblastic cells, LPA induces changes in the cytoskeleton and stimulates cell migration (18). Activation of the P2X7 receptor cation channel leads to LPA production and increases mineralization. As recently demonstrated, LPA₄-deficient mice have increased bone mass (19). LPA₁ knock-out mice LPA₁^{-/-}, exhibit impaired suckling behavior and neurological abnormalities (1). Nevertheless, the role of the LPA₁ receptor has to date not been extensively examined with regard to bone formation in vivo.

Therefore, LPA and its receptors may act in a manner that involves paracrine pathways in the growth plate and bone. We attempted here to clarify the role of the LPA₁ receptor in vivo through

defining the bone phenotype of $LPA_1^{(-/-)}$ mice. Study of these mice has been performed namely by means of μ CT and histological analysis. Finally, bone marrow mesenchymal progenitors from $LPA_1^{(-/-)}$ mice have been tested for proliferation rate and osteoblastic differentiation.

Materials and methods:

Animals. For this study, the LPA₁^(-/-) mice initially generated by Contos et al. (20) were transferred and maintained in a C57BL/6 background. All data from this study are derived from this strain. Mice were genotyped using PCR analysis of tail or ear DNA to identify homozygous WT or LPA₁^(-/-) as previously described (20). All experiments were performed in accordance with the principles and guidelines established by the French Institute of Medical Research, INSERM, employing the principles and procedures dictated by the highest standards of humane animal care. Growth evaluation was also performed with the initial 129SvJ/C57BL6 and newly generated knock-out mouse strain. Body length (nose-to-anus distance) was measured at 1, 2, and 4 weeks of age and femur and tibia lengths were measured at 2 and 4 weeks.

Whole mount Alizarin red and Alcian blue staining. Mice were anaesthetized, eviscerated, skinned, and stained in Alcian blue (AB) solution (0.02% AB, 70% ethanol, 30% acetic acid) for 1 to 2 days. Samples were washed through a descending ethanol series treated with 1% trypsin in NaCl solution for 4 to 5 hours. After rinsing with pure NaCl solution, samples were transferred in 1% KOH solution containing Alizarin red (AR) dye for 12 to 24 hours. Finally, samples were washed through a graded glycerol series 25%, 50%, 75%, visualized and stored in 100% glycerol.

Radiological and histological analysis. Plain radiographs were taken using a soft X-ray apparatus (Softex CMB-2; Softex). For histological analysis, bone tissues (femur and tibia) of 4 week old mice were fixed in 4 % paraformaldehyde for 24 hours and decalcified with 10% EDTA for 14 days. After removing EDTA, samples were dehydrated in an ascending ethanol series, cleared in xylene and embedded in paraffin. 4µm-tissue sections were mounted on glass slides and stained with Masson's trichrome according to standard procedures. For immunohistochemistry antibodies against Ki67 (1:1200), and respective non-immune serums, were used according to manufacturer's instructions

(Vectastain Elite ABC kit, Burlingame, USA) and the signal was detected with an HRP-conjugated secondary antibody. Some skeletons were fixed in 70° ethanol, embedded in metacrylate and stained with alizarin red according to standard procedures.

High-resolution μ CT. Femurs and vertebrae of four-week old mice were scanned with a high resolution μ CT prototype (VivaCT40) from Scanco Medical as described by Kohlbrenner et al (21). At a 3D level, the following calculations were made as previously published (22): relative bone volume over total bone volume (BV/TV), bone surface over bone volume (BS/BV), trabecular number (Tb.N), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular separation (Tb.Sp), and bone mineral density (BMD_{trab}). Connectivity density (ConnD) and structure model index (SMI) were calculated without assuming a constant model, as previously described (22). SMI estimates the plate-rod characteristics of a structure; its value is 0 for an ideal plate, and 3 for an ideal rod, with intermediate values reflecting the volume ratio between rods and plates. The geometric degree of anisotropy (DA) is defined as the ratio between the maximal and minimal radius of the mean intercept length (MIL) ellipsoid. DA reduction is correlated with a more isotropic bone.

To analyze the femur cortex, cross-sectional slices were chosen and the following parameters were calculated: cortical thickness (Ct.Th), cortical area (Ct.Ar), marrow area (Ma.Ar), cross-sectional total area (T.Ar), and cortical bone mineral density (BMD_{cort}).

Cell cultures. mBMSC (murine bone marrow stromal cells) were obtained from the bone marrow of femurs and tibiae of WT and $LPA_1^{(-/-)}$ mice as described elsewhere (23). Cells were maintained in modified Eagle medium alpha (α MEM) with 10% fetal calf serum (FCS) before use. For proliferation assay, cells were seeded at 20 000 cells per well in 12 well plates and cultured for up to 10 days in medium consisting of α MEM supplemented with 10% FCS. The cells were harvested 2 days after seeding for the D0 time, and later at D3, D7 and D10. For mineralization assays (24), cells were

cultured for up to 14 days in DMEM with 10% FCS, 100 μ M L-ascorbate 2-phosphate which constituted osteogenic medium (OM) with 10 mM inorganic phosphate (Sigma).

DNA assay. Cell layers were washed in PBS, scraped with 0.1% NP40 and sonicated. The DNA content was measured using the Picogreen® assay as per manufacturer's instructions (Invitrogen, Molecular probes).

Mineralization assay. WT and LPA₁^(-/-). Calcium deposits were stained with 40 mM pH 4.2 AR solution as described previously(25). Briefly, at days 7 and 14 medium was removed and wells rinsed twice with PBS. Cells were fixed in 70% ethanol for 1 hour at 4°C. AR solution was added to each well for 5 minutes and rinsed 7 times in order to remove non specific staining.

Detection of serum biological markers. In order to evaluate nutritional and phosphocalcic status, WT and LPA₁^(-/-) mice were bled by retro-orbital puncture at 4 weeks. Blood samples were allowed to clot for 30 minutes and centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm. Levels of serum glucose, iron, albumin, vitamin D, calcium, magnesium, and phosphorus were measured using conventional enzymatic methods with an OLYMPUS AU400 biochemistry auto-analyzer.

Real time RT-PCR. After removing the bone marrow and grinding the bones, total RNA from WT and LPA₁^(-/-) radius and humerus was isolated using TRISOL solution (Sigma) (26) and quantified using an Agilent Ribogreen assay (Invitrogen, Molecular Probes). RNA was reverse transcribed to cDNA using the SuperArray RT2 First Strand kit (Tebu-bio Laboratories) according to manufacturer's instructions. Amplification of the cDNA and detection of target PCR product were conducted in an ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems), using the SuperArray Custom RT2 Profiler PCR Array (Tebu-bio Laboratories) according to the manufacturer's instructions. The targets measured included: Col 1, osteocalcin (OC), osterix (OSX), PTHR1, dentin mineral protein 1 (DMP1), alkaline phosphatase, (ALP), Smad 1, Runx2, and bone morphogenetic protein 2 (BMP2).

Results were analyzed using sequence detection software, from Applied Biosystems, and the relative amount of target gene transcript was normalized to the amount of HPRT mRNA control transcript. The data represent analyses of RNA from four different, independent experiments and eight WT and LPA₁^(-/-) mice. Data presented are relative mRNA levels calculated as $2^{-\Delta C_t \times 10^6}$ where $\Delta C_t = C_{t\text{gene of interest}} - C_{t\text{HPRT}}$.

Infrared spectroscopy. Infrared spectra were recorded from KBr pellets on a Nicolet Thermo Avatar 320 FTIR spectrometer between 400 and 4000 cm^{-1} . After removing the bone marrow, each sample of tibia and femur cortical bone tissue was ground into 100 mg of IR-grade KBr prior to pelletization. For each spectrum, the intensity of the bands between 1670 and 1500 cm^{-1} (which represent vibrations of the collagenous matrix) were compared to those at 1034, 607, and 572 cm^{-1} (corresponding to the phosphate vibrations of the apatite phase), (27,28) in order to determine the degree of mineralization of the bone tissue.

Statistics. Results are expressed as mean \pm (SEM). Groups were compared using Mann Whitney analyses as appropriate. Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

Results

Skeletal development is altered in $LPA_1^{(-/-)}$ mice.

Skeletal preparations of 4 week old $LPA_1^{(-/-)}$ mice colored with Alcian blue and Alizarin Red showed homogenous dwarfism as previously described (20) (Fig. 1A). In keeping with these first observations, $LPA_1^{(-/-)}$ mice displayed cranial deformities including shorter snouts and more widely spaced eyes relative to control siblings. Strikingly, 100% of the $LPA_1^{(-/-)}$ analyzed also displayed an abnormally shaped rib cage (Fig. 1A, close-up). Every mouse presented several sterno-distal rib fusions (Fig. 1A, close up). However, the abnormal patterning was not specific for a single pair of ribs and could affect two consecutive costal elements. In addition, the sternebrae, segments of the sternum, were shorter, crooked and thicker, with some triangular, and the number (7 normally) typically reduced to 6. Thus, the sternum appeared sinusoidal (Fig. 1A, close-up) suggesting a role of the LPA_1 receptor in cartilage and bone development of the sternum. However, the 1st and 2nd sterno-distal ribs remained unaffected. The number and shape of ribs was normal in the proximal and vertebro-distal parts of the dorsal segment. Taken together these observations suggest that the ventral mesenchymal and costo-vertebral connections are altered by a LPA_1 defect. Dorsal ossification of the ribs does not appear to be affected.

Furthermore, of importance, was the observation of delayed vertebral calcification and closure in the thoracic part of $LPA_1^{(-/-)}$ mice at 2 weeks of age (Fig. 1B). However, 2 weeks later ossification was achieved. Extremities of the vertebrae on the entire animal remained thicker in the 4-week old $LPA_1^{(-/-)}$ mice (colored in blue, Fig 1A, arrow), indicating growth plate immaturity.

The overall phenotype of $LPA_1^{(-/-)}$ mice indicate a role for LPA_1 in the processes of skeletal development involving sternocostal and vertebral elements. LPA_1 receptor deficiency also appears to cause altered endochondral ossification.

$LPA_1^{(-/-)}$ mice exhibit abnormal growth.

In the original study, $LPA_1^{(-/-)}$ mice were described with shorter snouts and smaller heads (20). As shown with the skeletal preparations, radiographic analysis at 4 weeks of age confirmed this craniofacial phenotype (Fig. 1C). In addition, the short stature of $LPA_1^{(-/-)}$ mice was due to growth defects in the limbs as well as the vertebrae (Fig. 1D). The growth retardation was moderate at one week of age, the pups having a crown-rump length approximately 95% that of wild-type (WT) pups (31.6 (± 1.15) vs. 33.2 (± 1.78) mm, respectively) (Fig. 1D). Dwarfism became more apparent as $LPA_1^{(-/-)}$ mice grew. The difference in crown-rump lengths between $LPA_1^{(-/-)}$ mice and their WT littermates reached 15.7% at 2 weeks after birth (44.6 (± 11.5) vs. 52.9 (± 15.8), $p < 0.001$), and 13.1% at 4 weeks (58.8 (± 4.9) vs. 67.7 (± 1.6), $p < 0.004$) (Fig. 1D). Anthropometric analysis using soft X-ray analyses showed decreased longitudinal size of the limb bones in $LPA_1^{(-/-)}$ mice (Fig. 1E). The length of a number of skeletal components was significantly decreased. The femoral and tibial longitudinal lengths were respectively decreased by 20% (6.55 mm (± 0.19) vs. 5.47 (± 0.15), $p < 0.001$) and by 16% (8.85 mm (± 0.24) vs. 7.65 (± 0.13), $p < 0.001$) in two-week old $LPA_1^{(-/-)}$ mice (Fig. 1E). The difference remained significant at four weeks of age (Fig. 1E). No differences in lengths were observed between males and females at any stage.

Profile X-ray analysis of the $LPA_1^{(-/-)}$ mice suggested lower mineralization in the upper part of the spine, which is in agreement with the delay of vertebrae calcification observed in the skeletal preparations. Both the femur and tibia at four weeks also revealed a lower degree of mineral content especially in the cortical bone.

Skeletal abnormalities of ribs, limbs, vertebrae, and the lower mineral content observed demonstrate altered ossification.

Growth plate modifications in $LPA_1^{(-/-)}$ mice.

Several of the observations described above suggested abnormal endochondral ossification in $LPA_1^{(-/-)}$ mice. To assess growth plate modifications, we performed a microscopic analysis of the femoral and tibial bones of $LPA_1^{(-/-)}$ mice. Microscopic analysis demonstrated marked narrowing of

the growth plate of the long bones. As shown in the Figure 2A, and quantified in 2B, the overall size of the growth plate was decreased in two-week old $LPA_1^{(-/-)}$ mice in comparison to their WT littermates. The proximal tibia was significantly affected with a 27.7% decrease ($0.34 (\pm 0.02)$ vs. $0.47 (\pm 0.01)$ mm, $p < 0.006$) (Fig. 2B).

As shown in the proximal growth plate of the femur, the reserve zone was relatively preserved in $LPA_1^{(-/-)}$ mice compared to WT (Fig. 2A). In contrast, the columnar proliferative zone was clearly decreased (Fig. 2A lower). The hypertrophic zone was not significantly affected. Quantification of the different zones showed a significant decrease in the proliferative zone of $LPA_1^{(-/-)}$ mice, especially in the tibia growth plates which were diminished by 37.8% ($0.23 (\pm 0.02)$ vs. $0.37 (\pm 0.01)$, $p < 0.01$) (Fig. 2B lower left).

Other abnormalities were also detectable in the growth plate of $LPA_1^{(-/-)}$ mice. The columnar structures were less regular and less organized in comparison to WT (Fig. 2A lower). Application of Ki67 antibody to quantify the mitotic index in the proliferative zone, cell proliferation appeared decreased by 31% in the proliferative zone of $LPA_1^{(-/-)}$ mice ($p < 0.01$) (Figure 2C).

Given the usual coupling of chondrogenesis and osteogenesis in endochondral ossification, we analyzed the bone tissue of $LPA_1^{(-/-)}$ mice. Quantification by alizarin red of the mineralized tissue in the proximal tibia demonstrated a 30% decrease in $LPA_1^{(-/-)}$ mice ($n = 6$, $P < 0.002$, Figure 2D).

$LPA_1^{(-/-)}$ mice display decreased vertebral and femoral bone mass and altered trabecular and cortical bone.

The bone phenotype of $LPA_1^{(-/-)}$ mice was further characterized by μ CT analysis at four weeks of age. The resulting analysis of the bone microarchitecture in vertebrae and femur are illustrated in Figures 3 and 4. Measurements demonstrated a dramatic decrease in bone volume over total volume (BV/TV) in the trabecular bone of the vertebrae and the femur (81%; $p = 0.008$ and 77% $p = 0.009$, respectively) (Fig. 3A, B, and C). This was essentially due to a reduction in the number and thickness of trabeculae. Decreased connectivity and increased trabecular spacing were also observed. Similar

changes were observed in the proximal femurs of $LPA_1^{(-/-)}$ mice with a 62% reduction of BV/TV ($p=0.05$) and a 58% decrease in trabecular number ($p=0.05$). SMI was higher in $LPA_1^{(-/-)}$ mice, indicative of a more rod-like structure. No significant difference of DA was observed between WT and $LPA_1^{(-/-)}$ mice (data not shown). Altogether these results suggest abnormal endochondral bone formation in $LPA_1^{(-/-)}$ mice.

The cortical bone was also affected with a reduction in cortical thickness by 32% in $LPA_1^{(-/-)}$ mice. The cortical area (Ct.Ar) was also significantly decreased by 37%, with the marrow area (Ma.Ar) remaining unchanged (Fig. 4A and B).

Interestingly, the “true” bone mineral density, as measured by μ CT, was not significantly modified in the femoral cortex and vertebrae trabecular bone of $LPA_1^{(-/-)}$ mice. Even, it was slightly increased by 6% in their femoral trabecular bone (Fig. 3B and 4B).

These data demonstrate quantitative and qualitative changes in the bone tissue in $LPA_1^{(-/-)}$ mice, resembling osteoporosis. Nevertheless, the overall mineralization process appears to be relatively preserved in $LPA_1^{(-/-)}$ mice.

Osteoid and hydroxyapatite composition is similar in $LPA_1^{(-/-)}$ mice and WT littermates

We further investigated the nutritional status of 4 week old $LPA_1^{(-/-)}$ mice as a possible contributor to their physical appearance. Glucose, albumin, iron, and protein plasma levels were comparable, suggesting that the overall nutritional status of the surviving mutant mice was not different from the WT littermates (Fig. 5A). Since bone mass alteration may also be secondary to alteration of calcium, phosphate, and vitamin D metabolism, these parameters were also analyzed. No differences between WT and $LPA_1^{(-/-)}$ mice (Fig. 5B) were observed, ruling-out perturbations of mineral homeostasis as a major factor in alteration of the skeletal phenotype.

Given the data obtained from BMD measurement by μ CT analysis the mineral content of the mouse skeletal tissues was also evaluated by infrared spectroscopy (Fig. 5C). When comparing the relative intensities of the vibration bands produced by the collagenous phase with those of the mineral

phase, it appeared that mineralization of the cortical bone was comparable between $LPA_1^{(-/-)}$ and WT mice (Fig 5D). These observations agree with the μ CT data showing a decrease in the bone content but unmodified mineralization.

Expression of osteoblast differentiation markers is decreased in bone of $LPA_1^{(-/-)}$ mice.

To evaluate the impact of LPA_1 receptor deletion on the transcription of osteoblast differentiation genes, RNA levels for bone markers were quantified by real-time PCR (Fig. 6). Most of the markers analyzed, characteristic of bone formation, were decreased. The early indicator of osteoblast differentiation, collagen 1, was significantly decreased by 28% ($p=0.04$) and osteocalcin levels were also significantly decreased by 35% ($p=0.02$). Other markers of osteoblast differentiation, i.e., osterix, PTH receptor or DMP1, were also decreased in $LPA_1^{(-/-)}$ mouse bone, with a 20%, 22%, and 30% reduction respectively, but not significantly. Interestingly, the mRNA level of Runx2, a transcription factor required for initial mesenchymal stem cell differentiation toward the osteoblastic lineage and acting upstream of osterix, was unchanged in $LPA_1^{(-/-)}$ mice compared to WT littermates. BMP2 and Smad1 expression were also reduced by 20% ($p=0.35$) and 29% ($p=0.14$) respectively in the $LPA_1^{(-/-)}$ bone tissue.

Altogether these data demonstrate that some markers of the osteoblastic differentiation, collagen 1 and osteocalcin, are significantly less expressed in $LPA_1^{(-/-)}$ mouse bone. All markers, excepted Runx2, demonstrated a trend to decrease, although not significantly. This suggests that the osteoblastic differentiation process is altered in $LPA_1^{(-/-)}$ mouse.

$LPA_1^{(-/-)}$ mice mBMSC exhibit impaired proliferation and differentiation processes in vitro.

To investigate further whether the impaired bone formation is the result of defective osteoblast proliferation, murine bone marrow mesenchymal (mBMSC) cells from $LPA_1^{(-/-)}$ and WT mice were cultured. Proliferation of mBMSC was tested in basal medium with 10 % FCS for 3, 7 and 10 days.

After decessing at D3, the DNA content of WT mBMSC increased significantly at D3 and D10. The DNA content was dramatically decreased in $LPA_1^{(-/-)}$ mBMSC. (Fig 7A).

The osteoblastic differentiation of WT and $LPA_1^{(-/-)}$ mBMSC was also tested in osteogenic medium. Alizarin red S staining showed a decreased mineralization in $LPA_1^{(-/-)}$ mice cultured mBMSC (Fig. 7B). Unresistingly, the mineralization defect of $LPA_1^{(-/-)}$ mBMSC compared to WT was partly restored at D14.

Discussion

LPA has been previously demonstrated to be involved in osteoblastic differentiation (11-17). However LPA interacts with a set of G protein coupled receptors, whose the major expressed in bone are LPA₁ and LPA₄. While LPA₄ seems to hinder osteogenesis (19), LPA₁, from previous reports, is supposed to promote bone development. The results presented here demonstrate that LPA₁^{-/-} mice exhibit bone defects and developmental abnormalities. An abnormal bone phenotype was observed both in the trabecular and cortical bones. In trabecular bone, it was clearly evident by the low values for bone volume, and the decreased number and thickness of trabeculae in LPA₁^{-/-} mice. Both vertebral and femoral trabecular bones were similarly affected. The SMI was also altered in LPA₁^{-/-} and is indicative of a more fragile network. The cortical thickness of femurs was also significantly decreased in LPA₁^{-/-} mice. Therefore LPA₁^{-/-} mice were severely affected by a global bone defect suggestive of osteoporosis. Nevertheless LPA₁^{+/-} animals were exempt from any abnormal bone phenotype, and no significant differences between male and females were observed (data not shown). Since both the cortical and trabecular bone were altered, it appears that the overall process of osteogenesis is impaired by the complete absence of LPA₁.

LPA₁^{-/-} mice also demonstrated significant growth deficiency and histological analysis of their growth plates suggesting that their endochondral differentiation was abnormal. In this regard, the smaller length (but not width) of the skull suggests decreased development of the sphenoid bone, which is under the dependence of endochondral ossification. The proliferative zone plates was specifically modified in the growth of LPA₁^{-/-} mice. The decreased size and activity of the proliferative zone, and the disorganized pattern in the columnar setting of the chondroblasts suggest involvement of LPA₁ in the early developmental process of endochondral ossification. Indeed, LPA₁ has been described in numerous cell models as powerfully promoting cell proliferation.

Strikingly, LPA₁^{-/-} mice also displayed developmental abnormalities. Modifications affected ribs and vertebrae development. Attachment of the ribs to the sternum was abnormal, with fusion of ribs observed in all LPA₁^{-/-} mice. Fused ribs are observed in a variety of conditions. Disruption of the

transcription factors Hoxa-9 results in fusion of the first and second ribs (29,30). More recent data showed that multiple developmental factors are involved in rib formation. In particular, *Hand2* overexpression summarizes LPA₁ defect, with no effect on Runx2 expression (31). Similar skeletal abnormalities are also observed in case of BMP defects (32). Absence of BMP4 and BMP7 is responsible for abnormal costo-sternal connections (32). We observed decreased BMP2 expression in LPA₁^(-/-) mouse bones. As shown in Figure 6, expression of several markers of bone differentiation is decreased in LPA₁^(-/-) mice bones. Namely, the expression of collagen 1 and osteocalcin is significantly decreased, but not Runx2. Interestingly, it has been suggested that osterix can be regulated independently of Runx2 via the BMP2 pathway (33). Therefore, in keeping with the data provided here, it is possible that LPA₁ deletion impairs osterix regulation through the BMP pathway. In keeping with this hypothesis is the fact that rib fusion may occur in case of altered endochondral ossification, with normal expression of Runx2 especially in the hyperthrophic zone.

Thus, the major effect of LPA₁ seems to promote osteogenesis by influencing early steps of chondroblast and osteoblast differentiation. Consequently, as demonstrated by the μ CT and infra red analysis, the bone mineral defect observed in LPA₁^(-/-) mice seems related more to “true” osteopenia than to a mineralization defect. The “true” mineral density measured by μ CT was not significantly decreased in LPA₁^(-/-) mice. Furthermore, the ratio of mineralized to organic phase measured by infra red analysis was slightly higher in LPA₁^(-/-) mice bones. Therefore, increased bone mineralization of LPA₁^(-/-) mice can be compensatory of their osteopenia. Beside this, the major parameters involved in the overall control of bone mass, including calcium, phosphate, and vitamin D were not modified in LPA₁^(-/-) mice.

The findings obtained with cultured mBMSC are consistent with the data observed in vivo. The LPA₁^(-/-) mBMSC demonstrated a highly decreased proliferation rate, which is in agreement with the effect of LPA₁^(-/-) as growth factor. In differentiation medium, the mineralization was initially decreased, but partly rescued at D14, suggestive of a delayed, but not completely impaired process. Interestingly, similar catching up process of osteogenesis involving bone progenitors has been

demonstrated in other models like thrifty phenotype models or dexamethasone-induced osteoporosis(34,35).

Thus, even if the osteoblastic differentiation process was not extensively studied here, the results obtained in vivo and with cultured mBMSC from LPA₁^(-/-) mice demonstrate an overall decreased osteogenesis. These results, which show the specific impact of the absence of LPA₁ in bone progenitors, are consistent with previous reports obtained with LPA and LPA₁ inhibitors (14-16,36). A still fascinating area regards the interplay of LPA receptors. Recent studies suggested opposite effects of LPA₁ and LPA₄ receptors on the development of bone mass, with a negative effect from LPA₄. (19). So far, these two receptors seem to be the most involved in the regulation of bone metabolism. LPA₁ has been described to activate several intracellular cascades, namely G_i, G_q and G_{12/13} pathways (6). The G_i pathway is usually associated with increased proliferation rate and seems involved in osteoblastic proliferation (12). Nevertheless, overexpression of the G_i pathway has been associated with decreased osteogenesis (37). Therefore, it can be hypothesized that fine tuning the G_s and G_i pathways is necessary to optimize osteoblastic proliferation and differentiation. Such tuning will also depend on the presence of LPA in the medium around osteoblastic progenitors. A number of models have described local control of the LPA-LPA₁ pathway, with paracrine secretion of LPA (7-10). In this regard, we have observed that human MSC produce significant levels of secreted LPA with micromole concentrations of LPA present in conditioned osteogenic medium (personal unpublished results).

While our study points out the impact of the effect of LPA₁ on osteogenesis, its effect on bone resorption has also been documented (38). From this, a “seed and soil” can be hypothesized (39), involving LPA/LPA₁ in bone development and turnover with an overall positive effect of LPA₁ on osteogenesis.

In summary, LPA₁^(-/-) mice display defects in bone formation as well as developmental abnormalities indicating functional involvement of the LPA₁ receptor in osteogenesis. Thus, both endochondral ossification and modeling/remodeling processes of bone formation seem affected by

LPA₁ deficiency. Given the active emergence of therapeutics implicating lysophospholipids and their receptor, bone could be an important target for such drugs in the future.

Acknowledgments

We thank N. Laroche from INSERM U890 and Saint-Etienne University for technical assistance in μ CT analysis. We thank E Gouze from INSERM U563 for critical discussion. We also thank A. Tridon from the zootechnic platform and C. Carriven, A. Bros, M. Nieto and L. Micheletti for their technical support.

References

1. Anliker B, Chun J. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 2004; 279:20555-20558.
2. Birgbauer E, Chun J. New developments in the biological functions of lysophospholipids. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63:2695-2701.
3. Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, Pyne S, Tigyi G. International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 2002; 54:265-269.
4. Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem* 2004; 73:321-354.
5. Noguchi K, Herr D, Mutoh T, Chun J. Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9:15-23.
6. Choi J, Herr D, Noguchi K, Yung Y, Lee C, Mutoh T, Lin M, Teo S, Park K, Mosley A, Chun J. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50:157-186.
7. Fourcade O, Simon MF, Viode C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournie B, Sarda L, Chap H. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 1995; 80:919-927.
8. Gaits F, Fourcade O, Le Balle F, Gueguen G, Gaige B, Gassama-Diagne A, Fauvel J, Salles JP, Mauco G, Simon MF, Chap H. Lysophosphatidic acid as a phospholipid mediator: pathways of synthesis. *FEBS Lett* 1997; 410:54-58.
9. Ferry G, Tellier E, Try A, Gres S, Naime I, Simon MF, Rodriguez M, Boucher J, Tack I, Gesta S, Chomar P, Dieu M, Raes M, Galizzi JP, Valet P, Boutin JA, Saulnier-Blache JS. Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem* 2003; 278:18162-18169.
10. Pagès G, Girard A, Jeanneton O, Barbe P, Wolf C, Lafontan M, Valet P, Saulnier-Blache JS. LPA as a paracrine mediator of adipocyte growth and function. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 905:159-164.
11. Caverzasio J, Palmer G, Suzuki A, Bonjour JP. Evidence for the involvement of two pathways in activation of extracellular signal-regulated kinase (Erk) and cell proliferation by Gi and Gq protein-coupled receptors in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 2000; 15:1697-1706.
12. Grey A, Banovic T, Naot D, Hill B, Callon K, Reid I, Cornish J. Lysophosphatidic acid is an osteoblast mitogen whose proliferative actions involve G(i) proteins and protein kinase C, but not P42/44 mitogen-activated protein kinases. *Endocrinology* 2001; 142:1098-1106.
13. Ahmed I, Gesty-Palmer D, Drezner MK, Luttrell LM. Transactivation of the epidermal growth factor receptor mediates parathyroid hormone and prostaglandin F2 alpha-stimulated mitogen-activated protein kinase activation in cultured transgenic murine osteoblasts. *Mol Endocrinol* 2003; 17:1607-1621.
14. Gidley J, Openshaw S, Pring ET, Sale S, Mansell JP. Lysophosphatidic acid cooperates with 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ in stimulating human MG63 osteoblast maturation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2006; 80:46-61.
15. Panupinthu N, Rogers JT, Zhao L, Solano-Flores LP, Possmayer F, Sims SM, Dixon SJ. P2X $_7$ receptors on osteoblasts couple to production of lysophosphatidic acid: a signaling axis promoting osteogenesis. *J Cell Biol* 2008; 181:859-871.
16. Panupinthu N, Zhao L, Possmayer F, Ke HZ, Sims SM, Dixon SJ. P2X $_7$ nucleotide receptors mediate blebbing in osteoblasts through a pathway involving lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 2007; 282:3403-3412.

17. Karagiosis SA, Karin NJ. Lysophosphatidic acid induces osteocyte dendrite outgrowth. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357:194-199.
18. Masiello LM, Fotos JS, Galileo DS, Karin NJ. Lysophosphatidic acid induces chemotaxis in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Bone* 2006; 39:72-82.
19. Liu YB, Kharode Y, Bodine PV, Yaworsky PJ, Robinson JA, Billiard J. LPA induces osteoblast differentiation through interplay of two receptors: LPA1 and LPA4. *J Cell Biochem*. 2010; 109:794-800.
20. Contos JJ, Ishii I, Chun J. Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* 2000; 58:1188-1196.
21. Kohlbrenner A, Koller B, Hammerle S, Rueggsegger P. In vivo micro tomography. *Adv Exp Med Biol* 2001; 496:213-224.
22. David V, Laroche N, Boudignon B, Lafage-Proust MH, Alexandre C, Rueggsegger P, Vico L. Noninvasive in vivo monitoring of bone architecture alterations in hindlimb-unloaded female rats using novel three-dimensional microcomputed tomography. *J Bone Miner Res* 2003; 18:1622-1631.
23. Cai X, Lin Y, Ou G, Luo E, Man Y, Yuan Q, Gong P. Ectopic osteogenesis and chondrogenesis of bone marrow stromal stem cells in alginate system. *Cell Biol Int*. 2007; 31:776-783.
24. Oreffo RO, Kusec V, Romberg S, Triffitt JT. Human bone marrow osteoprogenitors express estrogen receptor-alpha and bone morphogenetic proteins 2 and 4 mRNA during osteoblastic differentiation. *J Cell Biochem* 1999; 75:382-392.
25. Stanford CM, Jacobson PA, Eanes DE, Lembke LA, Midura RJ. Rapidly Forming Apatitic Mineral in Osteoblastic cell line (UMR 10601 BSP). *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270:9420-9428.
26. Thèves C, Keyser-Tracqui C, Crubézy E, Salles JP, Ludes B, Telmon N. Detection and quantification of the age-related point mutation A189G in the human mitochondrial DNA. *Forensic Sci* 2006; 51:865-873.
27. Boskey AL, Goldberg M, Ashok K, Santiago G. Infrared imaging microscopy of bone: Illustrations from a mouse model of Fabry disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1758:942-947.
28. Chang MC, Tanaka J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. *Biomaterials* 2002; 23:4811-4818.
29. Chen F, Capecchi MR. Targeted mutations in *hoxa-9* and *hoxb-9* reveal synergistic interactions. *Dev Biol* 1997; 181:186-196.
30. McIntyre DC, Rakshit S, Yallowitz AR, Loken L, Jeannotte L, Capecchi MR, Wellik DM. Hox patterning of the vertebrate rib cage. *Development* 2007; 134:2981-2989.
31. Abe M, Michikami I, Fukushi T, Abe A, Maeda Y, Ooshima T, Wakisaka S. Hand2 regulates chondrogenesis in vitro and in vivo. *Bone* 2010; 46:1359-1368.
32. Katagiri T, Boorla S, Frendo JL, Hogan BL, Karsenty G. Skeletal abnormalities in doubly heterozygous *Bmp4* and *Bmp7* mice. *Dev Genet*. 1998; 22:340-348.
33. Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, Yoneda T. BMP2 regulates Osterix through *Msx2* and *Runx2* during osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 2008; 283:29119-29125.
34. Oreffo ROC, Lashbrooke B, Roach HI, Clarke NMP, Cooper C. Maternal protein deficiency affects mesenchymal stem cell activity in the developing offspring. *Bone* 2003; 33:100-107.
35. Gafni RI, McCarthy EF, Hatcher T, Meyers JL, Inoue N, Reddy C, Weise M, Barnes KM, Abad V, Baron J. Recovery from osteoporosis through skeletal growth: early bone mass acquisition has little effect on adult bone density. *FASEB J*. 2002; 01-0640fje.
36. Grey A, Xu X, Hill B, Watson M, Callon K, Reid IR, Cornish J. Osteoblastic cells express phospholipid receptors and phosphatases and proliferate in response to sphingosine-1-phosphate. *Calcif Tissue Int* 2004; 74:542-550.

37. Yadav VK, Ryu JH, Suda N, Tanaka KF, Gingrich JA, Schutz G, Glorieux FH, Chiang CY, Zajac JD, Insogna KL, Mann JJ, Hen R, Ducy P, Karsenty G. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell* 2008; 135:825-837.
38. Boucharaba A, Serre CM, Gres S, Saulnier-Blache JS, Bordet JC, Guglielmi J, Clezardin P, Peyruchaud O. Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J Clin Invest* 2004; 114:1714-1725.
39. Ribatti D, Mangialardi G, Vacca A. Stephen Paget and the 'seed and soil' theory of metastatic dissemination. *Clinical and Experimental Medicine* 2006; 6:145-149.

Figure 1

Gross phenotype of $LPA_1^{(-/-)}$ mice.

Alizarin red S (AR) and Alcian blue (AB) staining and X-ray analysis of $LPA_1^{(-/-)}$ and WT littermates.

(A) Skeletal staining of four-week old $LPA_1^{(-/-)}$ and WT mice showing homogenous dwarfism in $LPA_1^{(-/-)}$ mice (n=10). $LPA_1^{(-/-)}$ also show increased AB staining suggesting an alteration in the bone mineralization process. Close-up AR/AB staining of $LPA_1^{(-/-)}$ and WT mice rib cages demonstrates multiple sterno-distal rib fusions and sternbrae anomalies. Arrow: AB staining of Intervertebral discs and extremities of the vertebrae.

(B) At D14, $LPA_1^{(-/-)}$ thoracic vertebrae are smaller and not fully mineralized (arrow) when compared to WT littermates.

(C) Total body radiographs of the skeleton of four-week old $LPA_1^{(-/-)}$ and WT mice showing homogenous dwarfism and less mineralization in $LPA_1^{(-/-)}$ mice vertebrae and long bones.

(D) Growth curves of one-, two-, and four-week-old $LPA_1^{(-/-)}$ (black columns) and WT (white columns) mice (n=10, 15 and 10 respectively). (E) Representative radiographs of 4 week old $LPA_1^{(-/-)}$ and WT mice femurs (upper left) and tibiae (lower left) showing size and mineralization differences. Femur lengths of two- and four-week-old male and female $LPA_1^{(-/-)}$ (black columns) and WT (white columns) mice (n=6) (upper middle and right). Tibia lengths of two- and four-week-old male and female $LPA_1^{(-/-)}$ (black columns) and WT (white columns) mice (n=6) (lower middle and right). $LPA_1^{(-/-)}$ femur and tibia are smaller and less mineralized in the cortical and trabecular areas of the bone than WT littermates.

Values are means (SEM). Significant statistical differences between groups: ** $p < 0.01$, $LPA_1^{(-/-)}$ vs. WT by Mann Whitney Test.

Figure 2

Bone phenotype of the $LPA_1^{(-/-)}$ mice and WT littermates.

(A) Histological analysis of growth plates of two-week-old $LPA_1^{(-/-)}$ mice and WT littermates. Proximal extremities of femur (upper) were visualized after Masson's trichrome staining in order to analyze the morphology of the growth plates (GP) (x50). Growth plate is decreased with a normal reserve zone in $LPA_1^{(-/-)}$ mice. Higher magnification (x200) of the femur growth plate (lower) showing decreased proliferative zone (PZ).

(B) Histomorphometrical analysis and quantification, of the reserve, proliferative, and hypertrophic zones of the growth plate in the tibia and femur of $LPA_1^{(-/-)}$ (black columns) and WT (white columns) mice (n = 8).

(C) Immunodetection of Ki67, in the growth plate of two-week-old $LPA_1^{(-/-)}$ mice. Immunostaining with the Ki67 antibody (x100) and quantification of the positive cells in $LPA_1^{(-/-)}$ (black columns) and WT (white columns), showing decreased cell proliferation in the proliferative zone of $LPA_1^{(-/-)}$ mice (n=4).

(D) Alizarin red (AR) staining of the proximal extremity of the tibia in two-week-old $LPA_1^{(-/-)}$ mice and WT littermates. Mineralization area was quantified in pixels, $LPA_1^{(-/-)}$ (black columns) and WT (white columns) (n=4).

Values are means (SEM). Significant statistical differences between groups: ** $P < 0.01$, $LPA_1^{(-/-)}$ vs. WT by Mann Whitney Test.

Figure 3

Osteopenia in vertebrae and femur of $LPA_1^{(-/-)}$ mice.

(A) μ CT visualization of L_2 vertebra in four-week-old $LPA_1^{(-/-)}$ mice and WT littermates (n=6).

(B) μ CT visualization of trabecular area of the femur in four-week-old $LPA_1^{(-/-)}$ mice and WT littermates (n=6).

(C) High resolution μ CT parameters were measured in $LPA_1^{(-/-)}$ or WT mice (n=6). Values analyzed in L_2 vertebra and trabecular area of the femur were BV/TV, bone volume/total volume;

Tb.Th, trabecular thickness; Tb.N, trabecular number; Tb.Sp, trabecular spacing; ConnD, connectivity density; SMI, structure model index; BMD_{trab} , trabecular bone mineral density.

Values are means (SEM). Significant statistical differences between groups: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ of $LPA_1^{(-/-)}$ vs. WT by Mann Whitney Test.

Figure 4

Osteopenia in cortical region of the femur of $LPA_1^{(-/-)}$ mice.

(A) μ CT visualization of the cortical region of the femur in four-week-old $LPA_1^{(-/-)}$ mice and WT littermates. (n=6)

(B) High resolution μ CT parameters were measured in femurs of six four-week-old $LPA_1^{(-/-)}$ or WT mice as described in Methods. Values analyzed were Ct.Th, cortical thickness; Ct.Ar, cortical area; Ma.Ar, marrow area; T.Ar, cross-sectional total area; BMD_{cort} , cortical bone mineral density.

Values are means (SEM). Significant statistical differences between groups: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ of $LPA_1^{(-/-)}$ vs. WT by Mann Whitney Test.

Figure 5

Nutrition and mineral status of $LPA_1^{(-/-)}$ mice.

(A) Values of blood glucose (mmol/l), albumin and total proteins (g/l), 25 OH vitamin D (ng/ml), iron (mg/l). These values were similar in the $LPA_1^{(-/-)}$ and WT littermates (n=10).

(B) Values of total calcium, phosphate, and magnesium (mmol/l). Values were similar in the $LPA_1^{(-/-)}$ and WT littermates (n=10).

(C) Infrared spectra of the cortical area of femurs and tibiae did not show any clear difference in four-week-old $LPA_1^{(-/-)}$ (dotted line) or WT mice (black line) (n=8).

(D) Ratio of the absorbance at 1034 and 1660 cm^{-1} , which reflects the mineralization status (ratio of the mineral to organic phases) showed no differences between $LPA_1^{(-/-)}$ and WT mice (n= 8).

Values are means (SEM). Significant statistical differences between groups: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ of $LPA_1^{(-/-)}$ vs. WT by Mann Whitney Test.

Figure 6

Real time RT-PCR of bone markers in long bones of $LPA_1^{(-/-)}$ mice: RNAs was extracted from the humerus and radius of four-weeks-old $LPA_1^{(-/-)}$ and WT littermates (n=9). Expression of Runx2, collagen 1a (Col 1), alkaline phosphatase (ALP), osterix (OST), Osteocalcin (OC), PTH receptor 1 (PTHR1), dentin matrix protein 1 (DMP1), Smad1, BMP2, BMP7 and TGF β 1 was tested. Dashed line represents the level normalized to 100% of values observed in the WT. Columns represent the level of gene expression for the $LPA_1^{(-/-)}$ mice.

Values are means (SEM). Significant statistical differences between groups: * $p < 0.05$ of $LPA_1^{(-/-)}$ vs. WT by Mann Whitney Test.

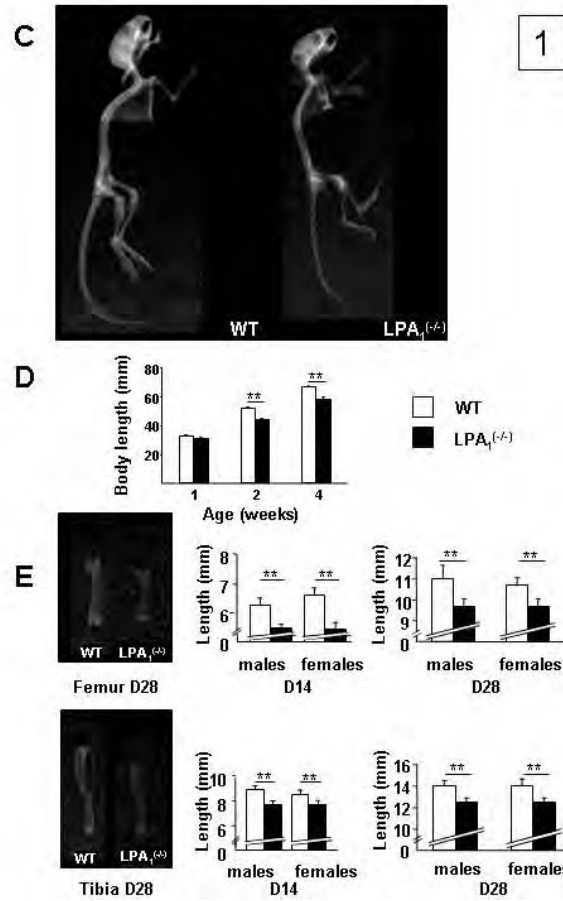
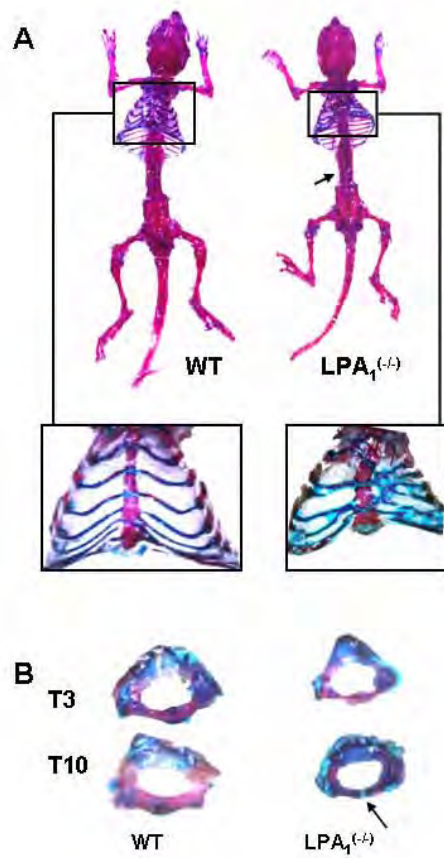
Figure 7

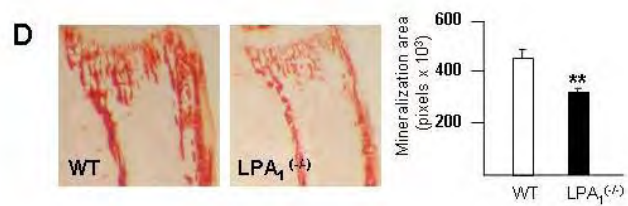
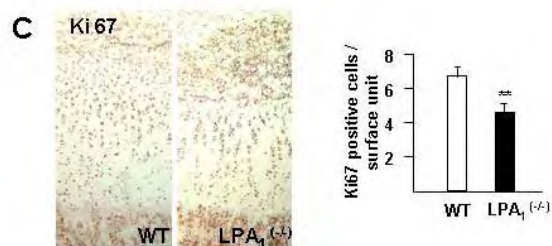
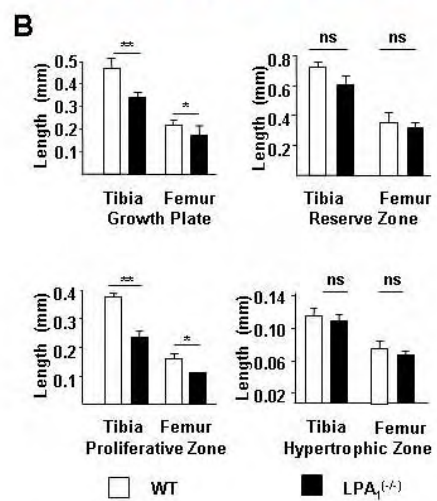
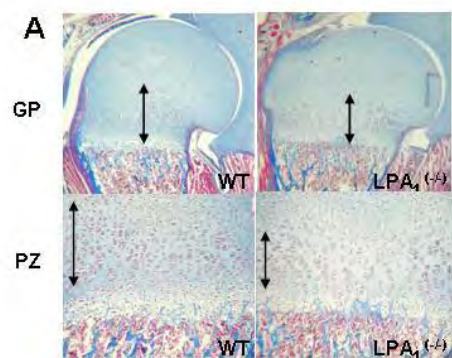
$LPA_1^{(-/-)}$ mice present delayed mineralization.

(A) WT and $LPA_1^{(-/-)}$ mBMSC were seeded and cultured two days (D0) in medium with 10% FCS (see *Methods*) and tested at D0, 3, 7, and 10 and DNA content was measured using the Picogreen® assay

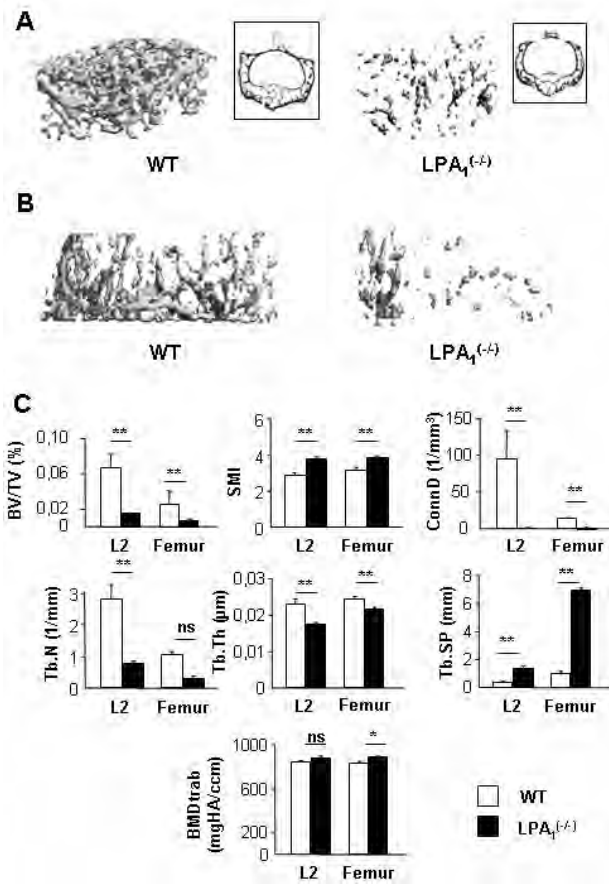
(B) mBMSC were cultured in osteogenic medium for 7, 10, or 14 days and stained with alizarin red S solution to evaluate mineralization. Lower mineralization at D7 and D10 was observed in $LPA_1^{(-/-)}$ mBMSC cultures.

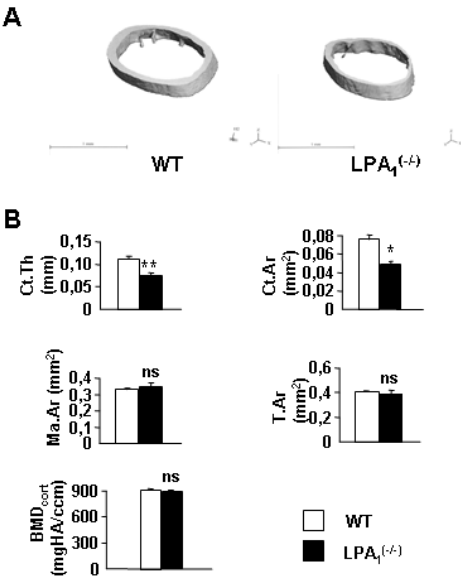
Values are means (SEM). Significant statistical differences between groups: ## $p < 0.001$ of WT D0 vs. D7 or D10 ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ of $LPA_1^{(-/-)}$ vs. WT by Mann Whitney Test.

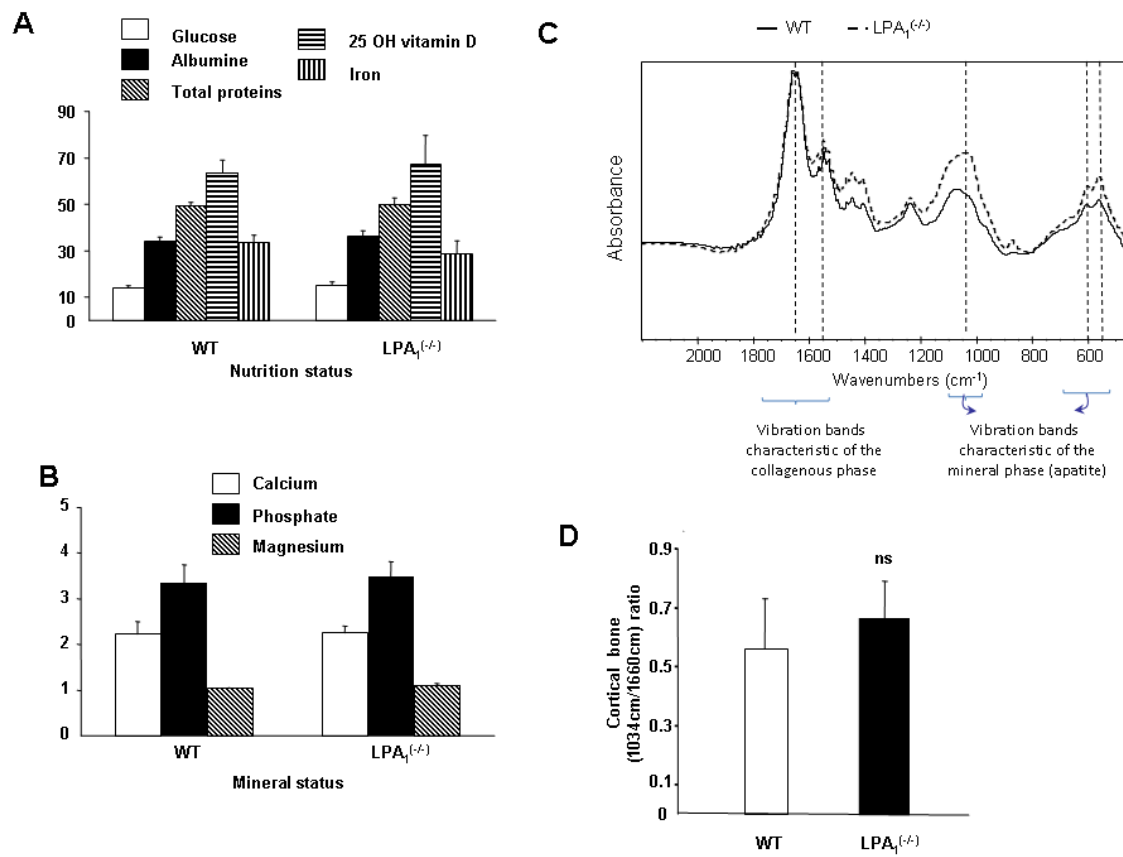


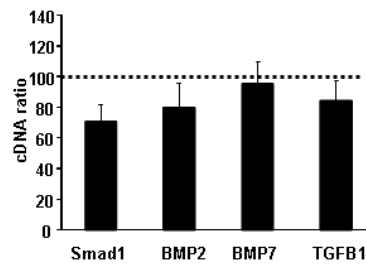
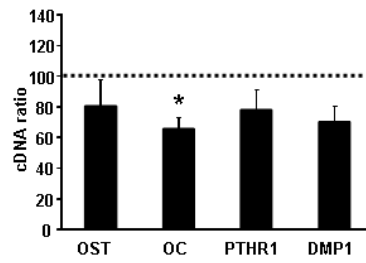
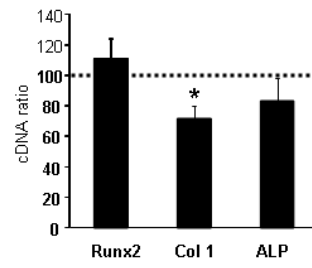


2

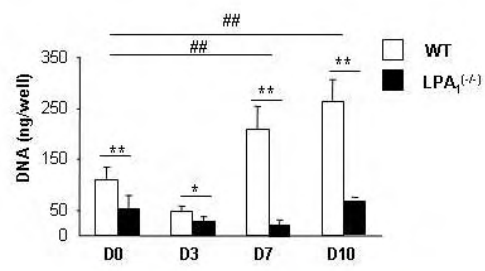




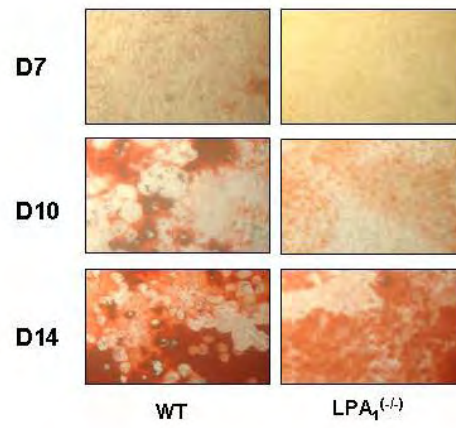




A



B



3- LPA et développement radiculaire

Suite au travail sur l'os et le cartilage et étant donné que de nombreux facteurs influençant le développement osseux influencent aussi le développement radiculaire, je me suis intéressée au rôle du LPA₁ dans le développement parodontal.

3-1 Méthodes :

Dans un premier temps j'ai réalisé des radiographies des têtes de ces animaux puis j'ai sacrifié par décapitation des souris témoin et LPA₁^(-/-) à J5, J14 et J28. Les têtes ont été fixées au paraformaldéhyde 3.7% pendant 2 à 4 jours, puis les mandibules ont été séparées et décalcifiées à l'EDTA 10% pendant 6 à 10 jours. Les tissus ont ensuite été déshydratés et inclus en paraffine et des coupes de 4µm ont été réalisées. Certaines coupes ont été colorées au Trichrome de Masson et d'autres ont été marquées par immunohistochimie avec les anticorps anti BMP-2 (1 :50), BMP-3 (1 :50), LPA₁ (1 :200) (SantaCruz Biotechnologies) et révélées par un anticorps secondaire lié à un complexe avidine-peroxidase (Vectastain Elite ABC kit, Burlingame, USA).

J'ai aussi analysé par spectroscopie à infrarouge le degré de minéralisation des dents des souris témoin et LPA₁^(-/-). Pour cela j'ai enregistré les bandes de vibration correspondant à la phase collagénique et apatite. Chaque spectre infra-rouge a été enregistré à partir de pastilles de KBr sur un spectromètre Nicolet Thermo Avatar 320 FTIR entre 400 et 4000cm⁻¹. Chaque échantillon de dent a été écrasé dans 100mg de KBr avant réalisation de pastilles. Pour chaque spectre, l'intensité des bandes entre 1670 et 1500 cm⁻¹ (représentatif des vibrations de la matrice collagénique) ont été comparées à celles situées à 1034, 607 et 572 cm⁻¹ (correspondant aux vibrations phosphate de la phase apatite) (232, 233) de façon à déterminer le degré de minéralisation des tissus dentaires.

Enfin, j'ai prélevé des cellules mésenchymateuses de souris témoin et LPA₁^(-/-) et je les ai mises en culture dans un milieu MEMα (*Modified Eagle Medium alpha*) avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 2 mM de L-glutamine, 10000 U/ml de pénicilline et 10000µg/ml streptomycine, à 37°C dans 5% CO₂ et 95% d'O₂. J'ai ensuite différencié ces cellules avec un milieu contenant du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) avec 1% de SVF auquel j'ai rajouté des EMD (50µg/mL) ou 100µM de L-ascorbate 2-phosphate ce qui constitue le milieu ostéogénique. J'ai comparé cette différenciation à différents temps (J3, 10,

14, 18, 21) la différenciation des mBMSC avec le milieu EMD et ostéogénique. J'ai mesuré cette différenciation en dosant la phosphatase alcaline.

Les cellules ont été rincées avec du PBS puis récupérées dans du NP40 à 0.1% et sonniquées. L'activité phosphatase alcaline a été mesurée en utilisant comme substrat *p*-nitrophenyl phosphate dans une solution tampon de 2-amino-2-méthyl-1-propanol alcaline (1.5M, pH 10.3 à 25°C) (Sigma). Le contenu en ADN a été mesuré en utilisant une méthode de dosage fluorescent grâce à la trousse Picogreen® (Invitrogen, Molecular probes). L'activité phosphatase alcaline spécifique est exprimée en nanomoles de *p*-nitrophenol/minute/ng ADN.

3-2 Résultats et discussion

Phénotype cranio-facial des souris $LPA_1^{(-/-)}$: comme décrit précédemment, les souris $LPA_1^{(-/-)}$ possèdent un museau aplati et une tête plus petite (7). L'analyse radiographique confirme ces données et permet de préciser qu'aucun os n'est manquant (figure 42 A). De façon intéressante, j'ai pu constater que la longueur naso-occipitale de la calvaria qui est sous la dépendance de la croissance sphénoïdale donc de l'ossification endochondrale est significativement diminuée chez la souris $LPA_1^{(-/-)}$ comparée aux souris témoin (9,81 (4.9) vs. 12.2 (1.7) mm n = 15, $P < 0.0001$) (figure 42 B). Ces anomalies confirment donc un défaut endochondral. L'analyse par μ CT montre, de façon plus spécifique, une diminution de la minéralisation de la jonction cranio-cervicale (figure 42 C).

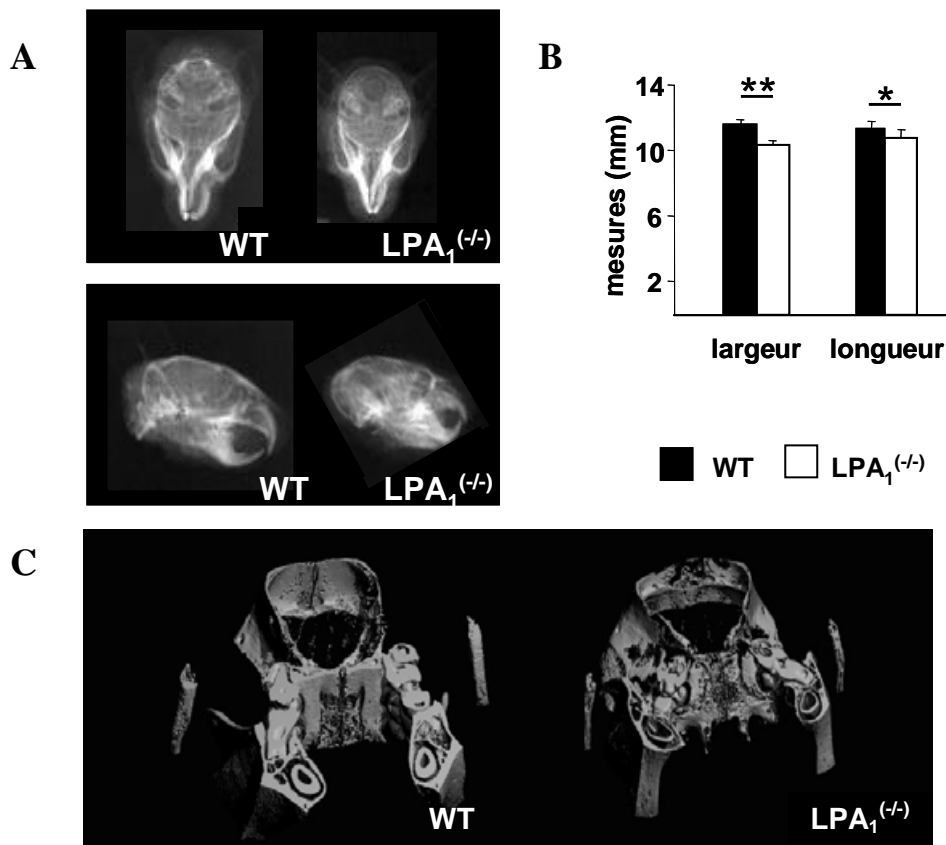


Fig. 42 : Phénotype cranio-facial des souris $LPA_1^{(-/-)}$ et témoin. **A** : Image radiographique du crâne de souris WT et $LPA_1^{(-/-)}$ vue coronale (en haut) et sagittale (en bas). **B** : Mesures de la longueur et de la largeur du crâne des souris WT et $LPA_1^{(-/-)}$. **C** : Image en μ CT de la jonction cranio-cervical des souris WT et $LPA_1^{(-/-)}$.

Phénotype dentaire des souris $LPA_1^{(-/-)}$: chez la souris le développement radiculaire débute à la fin de la formation coronaire, au 5^{ème} jour de vie. A ce stade aucune différence n'a été observée entre les souris témoin et $LPA_1^{(-/-)}$; la hauteur et la largeur coronaire sont similaires (figure 43 A).

A J15, pendant le développement de la portion cervicale de la racine dentaire, la GEH diminue en longueur et l'os alvéolaire et le parodonte sont mis en place. Les racines des souris $LPA_1^{(-/-)}$ sont significativement plus courtes que celles des souris témoin. Par ailleurs, elles possèdent moins de tissu minéralisé (cément et dentine radiculaire) et la quantité relative d'os alvéolaire inter-radiculaire est aussi diminuée. Cependant, aucune anomalie structurelle majeure n'a pu être observée (figure 43 A et C).

Enfin, à J28, au moment où la dent fait son éruption dans la cavité buccale, la racine est presque entièrement formée. L'involution de la GEH est presque achevée. A ce stade, la longueur radiculaire entre les souris témoin et $LPA_1^{(-/-)}$ est similaire mais ces dernières possèdent toujours une quantité relative de tissu cémento-dentinaire diminuée (figure 43 A, B et C). L'observation à plus fort grossissement de la région apicale des racines des souris $LPA_1^{(-/-)}$ permet de constater une présence plus importante de cément cellulaire appositionnel (figure 43 B). Celui-ci, se déposant plus rapidement que le cément acellulaire, pourrait compenser le retard de croissance de ces racines.

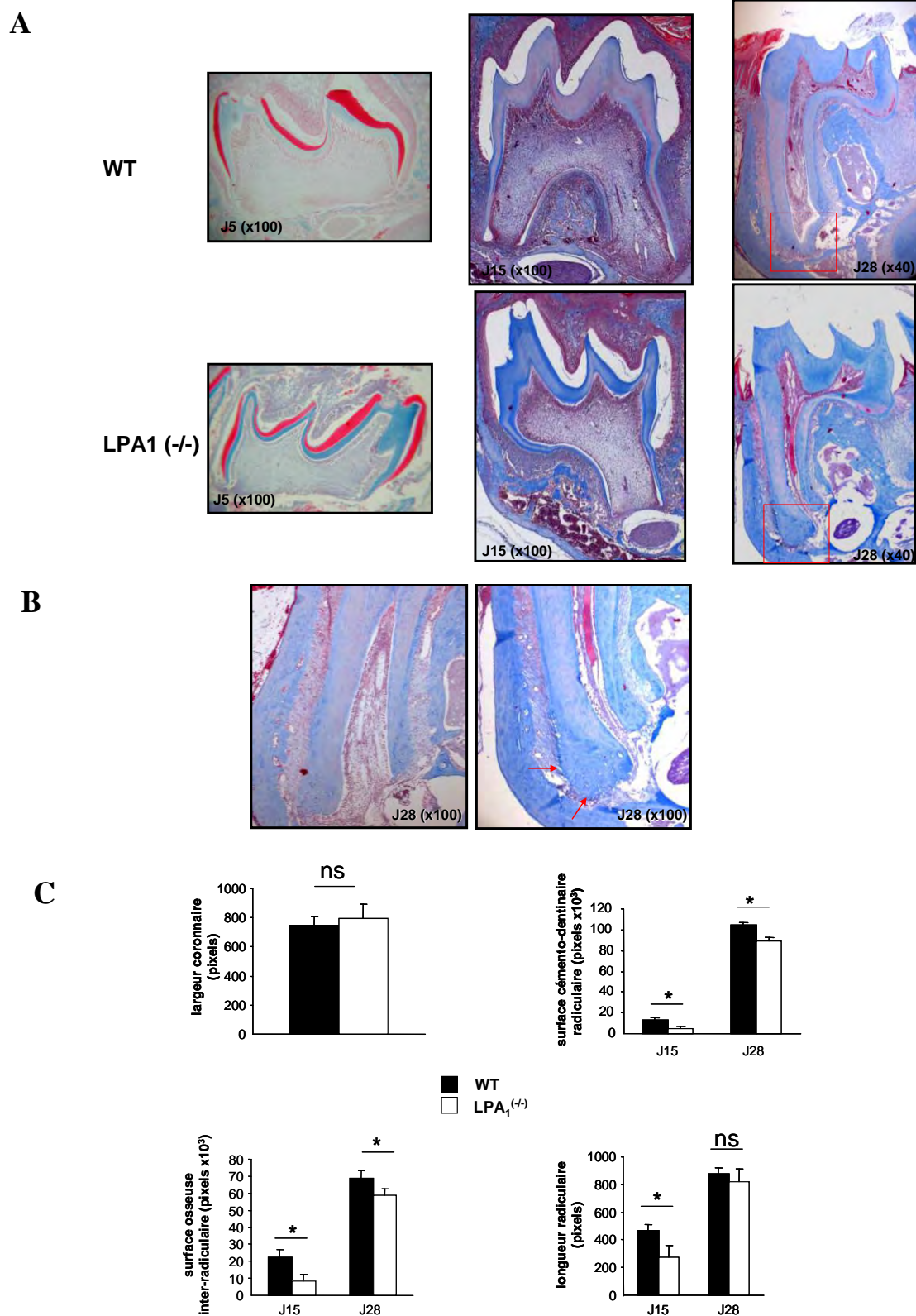


Fig. 43 : Phénotype dentaire des souris LPA₁^(-/-) : **A-** coupes histologiques colorées au Trichrome de Masson des dents de souris LPA₁^(-/-) et témoin. **B-** coupes histologiques de la partie apicale de la racine des souris LPA₁^(-/-) et témoin (x100). **C-** mesure et quantification relative par comptage du nombre de pixels de la largeur coronaire, la surface cémento-dentinaire radiculaire, la surface osseuse interradiculaire et la longueur radiculaire (*=p<0.5).

Spectroscopie à infra-rouge sur les dents de souris $LPA_1^{(-/-)}$ et témoin : l'analyse par spectroscopie à infra-rouge des dents de souris $LPA_1^{(-/-)}$ et témoin suggère une diminution de la minéralisation des dents des souris $LPA_1^{(-/-)}$ car l'intensité des bandes de vibration phosphate est inférieure comparées au témoin. Par contre en ce qui concerne les bandes de vibration colla génique, celles-ci sont similaires dans les deux cas (figure 44).

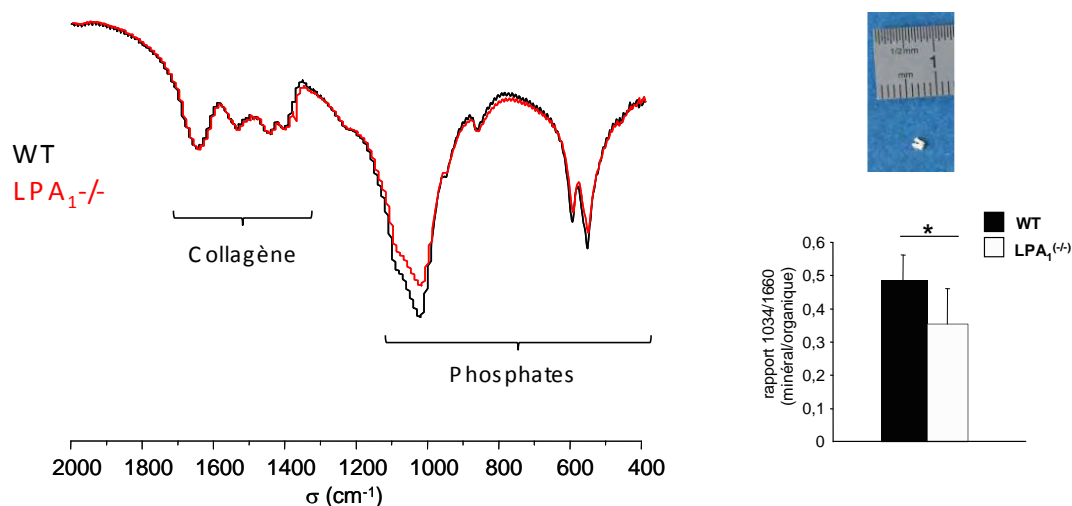


Fig. 44 : Spectroscopie à Infrarouge des dents de souris $LPA_1^{(-/-)}$ et témoin (*= $p<0.5$).

Immunolocalisation du récepteur LPA_1 , de BMP-2 et BMP-3 à J15 : J'ai ensuite cherché à savoir s'il existait une relation entre l'absence du récepteur LPA_1 et les BMP-2 et -3. Pour cela, j'ai réalisé des expériences d'analyse par immunohistochimie sur coupes de dents à J15 (figure 45).

Les résultats montrent que le récepteur LPA_1 est largement exprimé au niveau de la GEH et des odontoblastes radiculaires des souris témoins, il est aussi retrouvé au niveau des cémentoblastes radiculaires et est absent chez la souris $LPA_1^{(-/-)}$ (figure 45 A). La BMP-2, elle, est retrouvée comme précédemment décrit au niveau des 3 composants du parodonte que sont l'os alvéolaire, le ligament parodontal, les cémentoblastes radiculaire et des odontoblastes chez la souris témoin (2). Chez la souris $LPA_1^{(-/-)}$, le marquage est globalement beaucoup moins présent (figure 45 B). Par contre si la BMP-3 est peu retrouvée chez la souris témoin, notamment dans le ligament et au niveau de la partie externe de la racine dentaire, chez la souris $LPA_1^{(-/-)}$, le marquage est distinctement retrouvé au niveau de la pulpe, des odontoblastes radiculaires, du follicule fibreux et de l'os alvéolaire (figure 45 C). Il semblerait

que chez la souris $LPA_1^{(-/-)}$, la balance entre les BMP-2 et -3 soit inversée par rapport à la souris témoin ce qui pourrait expliquer la diminution de la formation de tissu minéralisé os alvéolaire et cémento-dentinaire radiculaire (figures 45 B et C).

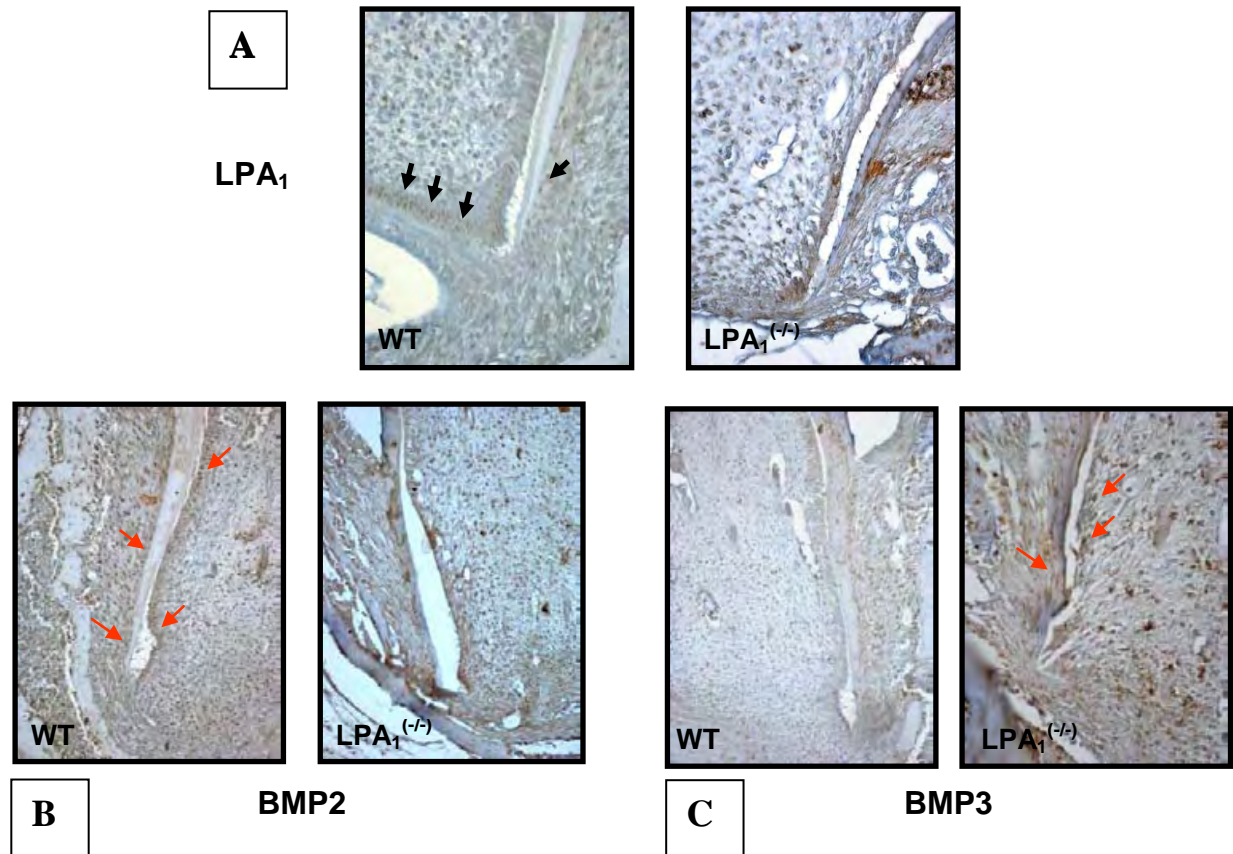


Fig. 45 : Immunolocalisation de LPA₁, BMP-2 et BMP-3 au niveau du parodonte des souris $LPA_1^{(-/-)}$ et témoin à J15. **A :** Immunolocalisation de LPA₁ chez la souris WT et $LPA_1^{(-/-)}$, les flèches noires montrent la présence du LPA₁ dans la GEH et les cémentoblastes chez la souris WT. **B :** Immunolocalisation de BMP-2 chez la souris WT et $LPA_1^{(-/-)}$, les flèches rouges montrent la présence de BMP-2 dans les odontoblastes et cémentoblastes radiculaires chez la souris WT. **C :** Immunolocalisation de BMP-3 chez la souris WT et $LPA_1^{(-/-)}$, les flèches rouges montrent la présence de BMP-3 dans les odontoblastes et cémentoblastes radiculaires chez la souris $LPA_1^{(-/-)}$.

Différenciation des mBMSC par les EMD : Enfin, j'ai différencié les mBMSC des souris témoin avec des EMD ou un milieu ostéogénique (OM) et dosé l'activité phosphatase alcaline. Le graphique montre clairement que des mBMSC de souris peuvent être différenciées par les EMD comme par le milieu OM. L'activité phosphatase alcaline est même significativement plus importante à J10 et J14 (figure 46). Je suis en train de corrélérer cela avec d'une part la recherche à ces temps là de marqueurs cémentoblastiques comme la CAP et d'autre part comparer ces résultats à ceux obtenus avec les mBMSC des souris $LPA_1^{-/-}$. Pour des raisons de culture cellulaire, ces résultats ne sont pas encore disponibles.

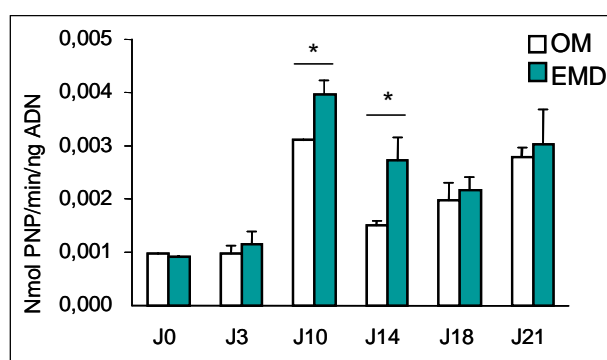


Fig. 46 : Effet des EMD et du milieu ostéogénique (OM) sur les mBMSC témoin. Dosage de l'activité phosphatase alcaline (*= $p < 0.05$).

L'ensemble de ces résultats confirme que le LPA_1 est un facteur impliqué dans le développement parodontal. L'absence de ce récepteur entraîne des modifications au niveau des tissus minéralisés parodontaux. Par ailleurs, il semblerait que le LPA_1 influencerait la cinétique d'expression des BMP-2 et-3.

CONCLUSIONS-PERSPECTIVES

Nous avons vu que le LPA pouvait agir à la fois sur les ostéoblastes et l'ostéogenèse (5, 6) mais aussi par sa production via l'autotaxine sur les ostéoclastes et l'ostéoclasie (3, 4, 158, 167).

Nos résultats montrent que la souris $LPA_1^{(-/-)}$ présente une anomalie de l'ossification endochondrale. Le LPA_1 agirait en influençant les premiers stades de la différenciation chondroblastique et ostéoblastique mais aussi les étapes de modelage/remodelage osseux. Une diminution est observée en l'absence de l'expression de LPA_1 chez les souris $LPA_1^{(-/-)}$. Ceci peut-être interprété à la fois comme une diminution de l'ostéoclasie et de l'ostéoformation conduisant potentiellement à une adynamie osseuse. Nous n'avons pas testé l'hypothèse d'un effet sur la résorption. Cependant les travaux de Peyruchaud et coll. démontrent que l'activation de la voie autotaxine/LPA stimule à la fois les cellules cancéreuses et les ostéoclastes contrôlant ainsi la progression de métastases osseuses ostéolytiques (3, 4, 167). Nous avons testé l'hypothèse d'un effet du LPA_1 sur la prolifération et la formation osseuse. Nous avons observé des effets négatifs sur les cultures de mBMSC au niveau du potentiel de prolifération et de minéralisation à partir des souris $LPA_1^{(-/-)}$. Ces données sont en accord avec les données de la littérature (5, 6, 218, 234). Les expériences de culture cellulaire sur les mBMSC suggèrent toutefois un « rattrapage » possible de la minéralisation osseuse qui ne serait que retardée dans le temps. Notre étude montrerait alors plutôt une ostéopénie vraie en relation avec le déficit de prolifération clonal plus qu'un défaut de minéralisation. Ce phénomène de « rattrapage » a déjà été observé dans d'autres modèles comme des modèles d'induction de l'ostéoporose par la dexaméthazone (235, 236). En accord avec ceci, l'analyse de la densité minérale osseuse en μ CT et celle de la composition minérale en spectroscopie à infra-rouge suggèrent une minéralisation normale du tissu osseux des souris $LPA_1^{(-/-)}$.

Ces données suggèrent un impact du LPA sur la prolifération des cellules souches que l'on observe au niveau de la zone proliférative et sur la différenciation endochondrale des souris $LPA_1^{(-/-)}$.

L'implication de la voie G_i est particulièrement intéressante à considérer. C'est une voie de signalisation habituellement mise en jeu en aval du LPA_1 , lequel active par ailleurs les voies G_q et $G_{12/13}$ (237). Le LPA par la voie G_i est associée à une augmentation de la prolifération ostéoblastique in vitro (213). Cependant, in vivo, la surexpression de G_i est

associée à une diminution de l'ostéogenèse (33, 238) et la surexpression de G_s aboutit quant à elle à une augmentation de la masse osseuse (26, 28). Par contre dans le syndrome de MacCune Albright, l'activation continue de G_s produit un os dysplasique (30).

En raison des difficultés de culture de ces cellules ostéoblastiques de souris, des résultats convaincants n'ont pu être obtenus concernant les cascades intra-cellulaires en aval du LPA_1 dans les progéniteurs. Plusieurs facteurs peuvent l'expliquer, en particulier, des modifications de l'expression d'autres récepteurs du LPA particulièrement le LPA_4 qui paraît influencer négativement la différenciation ostéoblastique (217).

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'un équilibre entre les voies de signalisation G_i et G_s est nécessaire afin d'optimiser la prolifération et la différenciation ostéoblastique et dans lequel le LPA_1 pourrait être impliqué. Les éléments mis en jeu pour l'activation séquentielle des cascades G_s et G_i restent inconnus.

De ce point de vue, les concentrations de LPA dans l'environnement de l'ostéoblaste peuvent être déterminantes. Des modifications de signalisation, dépendant de la concentration de ligand et de l'expression des récepteurs en fonction du stade de différenciation pourraient être envisagées. Ceci pourrait intervenir pour moduler l'activité du LPA_1 . L'ostéoblaste pouvant produire du LPA (5, 6), les concentrations locales de LPA pourraient être élevées lors de l'apoptose massive des ostéoblastes en fin de différenciation par le phénomène de *flip flop* (3, 157). A l'inverse, nous avons observé que les cellules indifférenciées peuvent générer des quantités plus faibles de LPA (résultats non publiés, collaboration avec A. Tokumura). De ce fait, des variations de concentration du ligand pourraient contribuer à modifier la nature des cascades intracellulaires activées au niveau des cellules cibles.

Enfin, les phénomènes vasculaires sont importants dans l'ossification endochondrale. Dans ce contexte le LPA augmenterait la production d'autres facteurs comme le VEGF qui jouent un rôle essentiel dans l'ossification endochondrale et la formation osseuse (195, 200, 201).

Ces éléments peuvent constituer le support de travaux ultérieurs pour préciser le mécanisme d'action du LPA au niveau de l'os.

En ce qui concerne l'édification radiculaire, nous avons obtenus des résultats significatifs suggérant l'implication du LPA_1 . Son absence se traduit par une diminution de la cémentogenèse associé à un défaut de la minéralisation.

Contrairement à l'os, nous n'observons pas de réel rattrapage comme au niveau des tissus calcifiés parodontaux comme le montre l'analyse en spectroscopie à infra-rouge. Des

différences similaires peuvent être observées en physiopathologie où des anomalies de minéralisation dentaires sont associées à des anomalies osseuses sans altération de la densité minérale osseuse (239, 240). Une explication à cela serait que le turn-over parodontal ne peut se faire comme le turn-over osseux peut-être par l'absence de vascularisation au niveau du ciment. De plus, si nombre de facteurs influençant la formation osseuse et cémentaire sont similaires, la différenciation des cellules folliculaires en cémentoblastes n'est pas encore totalement élucidée.

Dans cette différenciation, le LPA pourrait être un co-facteur intéressant à prendre en compte. Il pourrait avoir un rôle double en régénération parodontale. D'une part, produit par les plaquettes lors de l'inflammation associée à la cicatrisation et à la régénération parodontale, d'autre part par les cellules mésenchymateuses folliculaires, il pourrait agir en augmentant la sécrétion d'autres facteurs comme les BMP indispensables à la différenciation cémentoblastique. Une administration de LPA exogène pourrait être envisagée dans ce contexte.

Une perspective intéressante de ce travail en plus d'étudier plus en détail les voies de signalisations associées au LPA-LPA₁ serait de préciser la relation entre LPA et BMP. Les résultats histologiques au niveau du développement radiculaire chez la souris semblent indiquer que la voie des BMPs classiquement décrite pendant le développement radiculaire serait modifiée. L'absence de LPA₁ semble influencer la balance BMP-2/BMP-3 et donc la formation des tissus minéralisés parodontaux.

La figure 47 résume les hypothèses relatives à l'intervention du LPA dans le contexte de l'ostéogenèse et de la différenciation radiculaire.

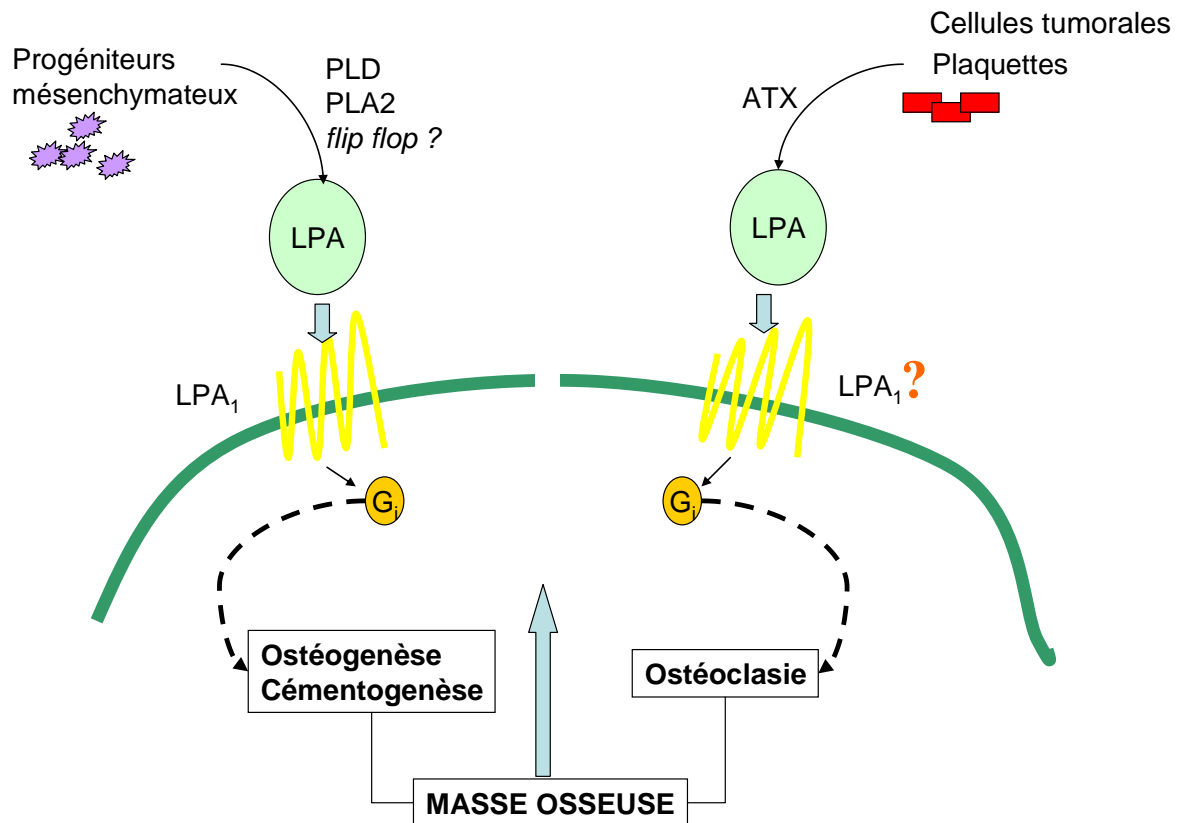


Fig. 47 : Implication du LPA₁ dans le contrôle de la masse osseuse.

Le LPA₁ agit à la fois sur la différenciation ostéoblastique et sur l'activation ostéoclastique. La modification de la balance résorption/formation peut jouer dans le sens d'un gain de masse osseuse si la formation est globalement plus importante. L'inhibition des deux peut conduire à une adynamie osseuse. La concentration de LPA dans les milieux dépend de plusieurs voies de synthèse.

Compte tenu de l'importance du LPA et LPA₁ dans le contrôle de la masse osseuse et de la balance ostéoclasie/ostéo-cémentogenèse, le LPA pourrait être une cible intéressante dans l'émergence de futures thérapies.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kemoun P, Laurencin-Dalichieux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-Auriol F, et al. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res.* 2007 Aug;329(2):283-94.
2. Kémoun P, Laurencin-Dalichieux S, Rue J, Vaysse F, Roméas A, Arzate H, et al. Localization of STRO-1, BMP-2/-3/-7, BMP receptors and phosphorylated Smad-1 during the formation of mouse periodontium. *Tissue and Cell.* 2007;39(4):257-66.
3. Boucharaba A, Serre CM, Gres S, Saulnier-Blache JS, Bordet JC, Guglielmi J, et al. Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J Clin Invest.* 2004 Dec;114(12):1714-25.
4. Boucharaba A, Serre CM, Guglielmi J, Bordet JC, Clezardin P, Peyruchaud O. The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jun 20;103(25):9643-8.
5. Panupinthu N, Rogers JT, Zhao L, Solano-Flores LP, Possmayer F, Sims SM, et al. P2X7 receptors on osteoblasts couple to production of lysophosphatidic acid: a signaling axis promoting osteogenesis. *J Cell Biol.* 2008 Jun 2;181(5):859-71.
6. Panupinthu N, Zhao L, Possmayer F, Ke HZ, Sims SM, Dixon SJ. P2X7 nucleotide receptors mediate blebbing in osteoblasts through a pathway involving lysophosphatidic acid. *J Biol Chem.* 2007 Feb 2;282(5):3403-12.
7. Contos JJ, Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Chun J. Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Nov 21;97(24):13384-9.
8. Horton WA, Degnin CR. FGFs in endochondral skeletal development. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2009;20(7):341-8.
9. Karsenty G. Chondrogenesis just ain't what it used to be. *J Clin Invest.* 2001 Feb;107(4):405-7.
10. Zelzer E, Olsen BR. The genetic basis for skeletal diseases. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):343-8.
11. Day TF, Yang Y. Wnt and Hedgehog Signaling Pathways in Bone Development. *J Bone Joint Surg Am.* 2008 February 1, 2008;90(Supplement_1):19-24.
12. M Michael Cohen Jr. The new bone biology: Pathologic, molecular, and clinical correlates. *American Journal of Medical Genetics Part A.* 2006;140A(23):2646-706.
13. Knothe Tate ML, Falls TD, McBride SH, Atit R, Knothe UR. Mechanical modulation of osteochondroprogenitor cell fate. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2008;40(12):2720-38.
14. Toppets V. PV, De Behr V., Antoine N., Dessy C., Gabriel A. Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Ann Méd Vét.* 2004;148:1-13.
15. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2008;40(1):46-62.
16. Govindarajan V, Overbeek P. FGF9 can induce endochondral ossification in cranial mesenchyme. *BMC Developmental Biology.* 2006;6(1):7.
17. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):332-6.
18. Tare RS, Babister JC, Kanczler J, Oreffo RO. Skeletal stem cells: phenotype, biology and environmental niches informing tissue regeneration. *Mol Cell Endocrinol.* 2008 Jun 25;288(1-2):11-21.

19. Xian CJ, BK. F. Repair of injured articular and growth plate cartilage using mesenchymal stem cells and chondrogenic gene therapy. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2006 May;1(2):213-29.
20. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WWK, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 1999;5(3):309-13.
21. Le Blanc K, Götherström C, Ringdén O, Hassan M, McMahon R, Horwitz E, et al. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation.* 2005 Jun15;79(11):1607-14.
22. Karl J. Jepsen, Christopher Price, Lee J. Silkman, Fred H. Nicholls, Phillip Nasser, Bin Hu, et al. Genetic Variation in the Patterns of Skeletal Progenitor Cell Differentiation and Progression During Endochondral Bone Formation Affects the Rate of Fracture Healing. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2008;23(8):1204-16.
23. Henry M Kronenberg. PTHrP and Skeletal Development. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2006;1068(Skeletal Development and Remodeling in Health, Disease, and Aging):1-13.
24. Chung UI, Lanske B, Lee K, Li E, Kronenberg H. The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 27;95(22):13030-5.
25. Guo J, Chung UI, Kondo H, Bringhurst FR, Kronenberg HM. The PTH/PTHrP receptor can delay chondrocyte hypertrophy in vivo without activating phospholipase C. *Dev Cell.* 2002 Aug;3(2):183-94.
26. Lee K, Lanske B, Karaplis AC, Deeds JD, Kohno H, Nissenson RA, et al. Parathyroid hormone-related peptide delays terminal differentiation of chondrocytes during endochondral bone development. *Endocrinology.* 1996 Nov;137(11):5109-18.
27. Schipani E, Lanske B, Hunzelman J, Luz A, Kovacs CS, Lee K, et al. Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochondral bone formation and rescues mice that lack parathyroid hormone-related peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Dec 9;94(25):13689-94.
28. Weir EC, Philbrick WM, Amling M, Neff LA, Baron R, Broadus AE. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Sep 17;93(19):10240-5.
29. Hoogendam J, Farih-Sips H, Wynaendts LC, Lowik CWGM, Wit JM, Karperien M. Novel Mutations in the Parathyroid Hormone (PTH)/PTH-Related Peptide Receptor Type 1 Causing Blomstrand Osteochondrodysplasia Types I and II. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 March 1, 2007;92(3):1088-95.
30. Weinstein LS. G(s)alpha mutations in fibrous dysplasia and McCune-Albright syndrome. *J Bone Miner Res.* 2006 Dec;21 Suppl 2:P120-4.
31. Lietman SA, Ding C, Cooke DW, Levine MA. Reduction in Gsalpha induces osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. *Clin Orthop Relat Res.* 2005 May(434):231-8.
32. Azeddine B, Letellier K, Wang da S, Moldovan F, A. M. Molecular determinants of melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Relat Res.* 2007 Sep;462:45-52.
33. Yadav VK, Ryu JH, Suda N, Tanaka KF, Gingrich JA, Schutz G, et al. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell.* 2008 Nov 28;135(5):825-37.

34. Horton WA, Hall JG, Hecht JT. Achondroplasia. *The Lancet*. 2007 2007/7/20;370(9582):162-72.
35. Dailey L, Laplantine E, Priore R, Basilico C. A network of transcriptional and signaling events is activated by FGF to induce chondrocyte growth arrest and differentiation. *The Journal of Cell Biology*. 2003 June 23, 2003;161(6):1053-66.
36. Teixeira CC, Agoston H, Beier F. Nitric oxide, C-type natriuretic peptide and cGMP as regulators of endochondral ossification. *Dev Biol*. 2008 Jul 15;319(2):171-8.
37. Moffatt P, Thomas G, Sellin K, Bessette M-C, Lafrenière Fo, Akhouayri O, et al. Osteocrin Is a Specific Ligand of the Natriuretic Peptide Clearance Receptor That Modulates Bone Growth. *Journal of Biological Chemistry*. 2007 December 14, 2007;282(50):36454-62.
38. Thomas G, Moffatt P, Salois P, Gaumond M-Hln, Gingras R, Godin Ar, et al. Osteocrin, a Novel Bone-specific Secreted Protein That Modulates the Osteoblast Phenotype. *Journal of Biological Chemistry*. 2003 December 12, 2003;278(50):50563-71.
39. Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Miura M, et al. Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med*. 2004;10(1):80-6.
40. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965 Nov 12;150(698):893-9.
41. ten Dijke P. Bone morphogenetic protein signal transduction in bone. *Current Medical Research and Opinion*. 2006;22(s1):S7-S11.
42. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988 Dec 16;242(4885):1528-34.
43. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone Morphogenetic Proteins, Their Antagonists, and the Skeleton. *Endocr Rev*. 2003 April 1, 2003;24(2):218-35.
44. Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins. *Bone*. 1999;25(1):91-3.
45. Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cellular Signalling*. 2004;16(3):291-9.
46. Vukicevic S, TK S. Bone Morphogenetic Proteins: From Laboratory to Clinical Practice. Basel Boston Berlin: Birkhauser: Birkhauser Verlag Edition; 2003.
47. von Bubnoff A, Cho K WY. Intracellular BMP Signaling Regulation in Vertebrates: Pathway or Network? *Developmental Biology*. 2001;239(1):1-14.
48. Mary B. Goldring, Kaneyuki Tsuchimochi, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006;97(1):33-44.
49. Steinert A, Weber M, Dimmler A, Julius C, Schutze N, Noth U, et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate. *J Orthop Res*. 2003;21:1090 - 7.
50. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng*. 1998;4:415 - 28.
51. Miljkovic ND, Cooper GM, Marra KG. Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16:1121 - 30.
52. Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet*. 2006;2:e216.
53. Tsuji K, Cox K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Tabin CJ, Rosen V. BMP4 is dispensable for skeletogenesis and fracture-healing in the limb. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90(Suppl 1):14 - 8.

54. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet.* 2006;38:1424 - 9.
55. Bai X, Xiao Z, Pan Y, Hu J, Pohl J, Wen J, et al. Cartilage-derived morphogenetic protein-1 promotes the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2004;325(2):453-60.
56. Chubinskaya S, Segalite D, Pikovsky D, Hakimiyan AA, Rueger DC. Effects induced by BMPS in cultures of human articular chondrocytes: Comparative studies. *Growth Factors.* 2008;26(5):275-83.
57. Yeh L-CC, Lee JC. Effects of cartilage-derived morphogenetic protein-3 on the expression of chondrogenic and osteoblastic markers in the pluripotent mesenchymal C3H10T1/2 cell line. *Growth Factors.* 2010;28(2):117-28.
58. Olexander Korchynskiy, Koen J. Decherling, Anneke M. Sijbers, Wiebe Olijve, Dijke PT. Gene Array Analysis of Bone Morphogenetic Protein Type I Receptor-Induced Osteoblast Differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2003;18(7):1177-85.
59. Bächner D, Ahrens M, Betat N, Schröder D, Gross G. Developmental expression analysis of murine autotaxin (ATX). *Mechanisms of Development.* 1999;84(1-2):121-5.
60. Karsenty G. Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:183-96.
61. Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanović M, et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature.* 1994 Dec 8;372(6506):525-30.
62. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, et al. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell.* 1994;79(6):1111-20.
63. Smith N, Dong Y, Lian JB, Pratap J, Kingsley PD, Wijnen AJv, et al. Overlapping expression of Runx1(Cbfa2) and Runx2(Cbfa1) transcription factors supports cooperative induction of skeletal development. *Journal of Cellular Physiology.* 2005;203(1):133-43.
64. Lee B, Thirunavukkarasu K, Zhou L, Pastore L, Baldini A, Hecht J, et al. Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia. *Nat Genet* 1997 Jul;16(3):307-10. 1997 Jul;16(3):307-10.
65. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, et al. Mutations Involving the Transcription Factor CBFA1 Cause Cleidocranial Dysplasia. *Cell.* 1997;89(5):773-9.
66. Masahiko I, Takahiro Y, Shintaro N, Seigou M, Kenji D, Miki H, et al. Maturation disturbance of chondrocytes in *Cbfa1*-deficient mice. *Developmental Dynamics.* 1999;214(4):279-90.
67. Parfitt AM. Misconceptions (1): epiphyseal fusion causes cessation of growth. *Bone.* 2002;30(2):337-9.
68. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune Response: The Key to Bone Resorption in Periodontal Disease. *Journal of Periodontology.* 2005;76(11-s):2033-41.
69. Garnero P, Souberbielle, J-C. Les dosages biologiques dans l'ostéoporose: Bioforma; 2007.
70. Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001 Jan;2(1):81-94.
71. Liu S, Quarles LD. How fibroblast growth factor 23 works. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Jun;18(6):1637-47.

72. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*. 2006 Dec 7;444(7120):770-4.
73. Yoshiko Y, Wang H, Minamizaki T, Ijuin C, Yamamoto R, Suemune S, et al. Mineralized tissue cells are a principal source of FGF23. *Bone*. 2007 Jun;40(6):1565-73.
74. Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, et al. High Bone Density Due to a Mutation in LDL-Receptor-Related Protein 5. *New England Journal of Medicine*. 2002;346(20):1513-21.
75. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, et al. LDL Receptor-Related Protein 5 (LRP5) Affects Bone Accrual and Eye Development. *Cell*. 2001;107(4):513-23.
76. Yadav VK, P D. Lrp5 and bone formation: A serotonin-dependent pathway. *Ann NY Acad Sci*. 2010;1192 103-9.
77. Yadav VK, Oury F, Suda N, Liu Z-W, Gao X-B, Confavreux C, et al. A Serotonin-Dependent Mechanism Explains the Leptin Regulation of Bone Mass, Appetite, and Energy Expenditure. *Cell*. 2009;138(5):976-89.
78. Ten Cate AR. The development of the periodontium — a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontology 2000*. 1997;13(1):9-19.
79. Goldberg M. *Manuel Histologie et Biologie Buccale*. 1st ed: Masson Paris; 1989.
80. Laurencin-McManus S. *Edification radiculaire de la première molaire mandibulaire de la souris*. Toulouse: Toulouse III; 2003.
81. Lassara D. *Signalisation par la voie des "bone morphogenetic protein" dans l'édification radiculaire*. Toulouse: Paul Sabatier; 2005.
82. Kenney EB, Ramfjord SP. Cellular Dynamics in Root Formation of Teeth in Rhesus Monkeys. *Journal of Dental Research*. 1969 January 1, 1969;48(1):114-9.
83. Heritier M FJ. [Microscopy and electron microscopy of the Hertwig sheath in the mouse]. *J Biol Buccale*. 1981 Dec;9(4):319-34.
84. Hosoya A, Kim J-Y, Cho S-W, Jung H-S. BMP4 signaling regulates formation of Hertwig's epithelial root sheath during tooth root development. *Cell and Tissue Research*. 2008;333(3):503-9.
85. Nakatomi M, Morita I, Eto K, Ota MS. Sonic Hedgehog Signaling is Important in Tooth Root Development. *Journal of Dental Research*. 2006 May 1, 2006;85(5):427-31.
86. Ten Cate A. The role of epithelium in the development, structure and function of the tissues of tooth support. *Oral Dis*. 1996 Mar;2(1):55-62.
87. Hirata A, Nakamura H. Localization of Perlecan and Heparanase in Hertwig's Epithelial Root Sheath During Root Formation in Mouse Molars. *J Histochem Cytochem*. 2006 October 1, 2006;54(10):1105-13.
88. Bosshardt DD, Nanci A. Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth. *Journal Of Clinical Periodontology*. 2004;31(3):184-92.
89. Fujiwara N, Akimoto T, Otsu K, Kagiya T, Ishizeki K, Harada H. Reduction of Egf signaling decides transition from crown to root in the development of mouse molars. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 2009;312B(5):486-94.
90. Fujiwara N, Tabata MJ, Endoh M, Ishizeki K, Nawa T. Insulin-like growth factor-I stimulates cell proliferation in the outer layer of Hertwig's epithelial root sheath and elongation of the tooth root in mouse molars in vitro. *Cell and Tissue Research*. 2005;320(1):69-75.
91. Thomas H. Root formation. *Int J Dev Biol*. 1995 Feb;39(1):231-7.

92. Schroeder HE SW. Cemento-enamel junction--revisited. *J Periodontal Res* 1988 Jan;23(1):53-9.
93. MacNeil RL, HF. T. Development of the murine periodontium. II. Role of the epithelial root sheath in formation of the periodontal attachment. *J Periodontol*. 1993 Apr;64(4):285-91.
94. MacNeil RL, MJ. S. Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *J Periodontal Res*. 1993 Nov;28(6 Pt 2):550-9.
95. McKee MD, Zalzal S, A. N. Extracellular matrix in tooth cementum and mantle dentin: localization of osteopontin and other noncollagenous proteins, plasma proteins, and glycoconjugates by electron microscopy. *Anat Rec*. 1996 Jun;245(2):293-312.
96. Bosshardt DD. Are Cementoblasts a Subpopulation of Osteoblasts or a Unique Phenotype? *Journal of Dental Research*. 2005 May 1, 2005;84(5):390-406.
97. Bosshardt DD SK. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol* 2000. 1997 Feb;13:41-75.
98. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontology* 2000. 2000;24(1):73-98.
99. Zeichner-David M. Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited. *Periodontology* 2000. 2006;41(1):196-217.
100. Luan X, Ito Y, Diekwisch TGH. Evolution and development of Hertwig's epithelial root sheath. *Developmental Dynamics*. 2006;235(5):1167-80.
101. Yamamoto T, Takahashi S. Hertwig's epithelial root sheath cells do not transform into cementoblasts in rat molar cementogenesis. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*. 2009;191(6):547-55.
102. MacNeil RL TH. Development of the murine periodontium. II. Role of the epithelial root sheath in formation of the periodontal attachment. *J Periodontol* 1993 Apr;64(4):285-91.
103. Owens P. The root surface in human teeth: a microradiographic study. *J Anat* 1976 Nov;122(Pt 2):389-401.
104. Bosshardt DD SH. Initial formation of cellular intrinsic fiber cementum in developing human teeth. A light- and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res* 1992 Feb;267(2):321-35.
105. Sequeira P BD, Schroeder HE. Growth of acellular extrinsic fiber cementum (AEFC) and density of inserting fibers in human premolars of adolescents. *J Periodontal Res*. 1992 Mar;27(2):134-42.
106. Gronthos S, Zannettino ACW, Graves SE, Ohta S, Hay SJ, Simmons PJ. Differential Cell Surface Expression of the STRO-1 and Alkaline Phosphatase Antigens on Discrete Developmental Stages in Primary Cultures of Human Bone Cells. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1999;14(1):47-56.
107. Hakki SS, Berry JE, Somerman MJ. The Effect of Enamel Matrix Protein Derivative on Follicle Cells In Vitro. *Journal of Periodontology*. 2001;72(5):679-87.
108. Zhao M, Xiao G, Berry JE, Franceschi RT, Reddi A, Somerman MJ. Bone Morphogenetic Protein 2 Induces Dental Follicle Cells to Differentiate Toward a Cementoblast/Osteoblast Phenotype. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2002;17(8):1441-51.
109. Shibata S, Dias RA, Hashimoto-Uoshima M, Abe T, Yanagishita M. Immunohistochemical Localization of Syndecan-1 in the Dental Follicle of Postnatal Mouse Teeth. *Journal of Periodontology*. 2007;78(7):1322-8.
110. Morsczeck C, Moehl C, Götz W, Heredia A, Schäffer TE, Eckstein N, et al. In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biology International*. 2005;29(7):567-75.

111. Saito M, Handa K, Kiyono T, Hattori S, Yokoi T, Tsubakimoto T, et al. Immortalization of Cementoblast Progenitor Cells With Bmi-1 and TERT. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2005;20(1):50-7.
112. Hammarström L AI, Fong CD. Origins of cementum. *Oral Dis* 1996 Mar;2(1):63-9.
113. Fong CD, Slaby I, Hammarström L. Amelin: An enamel-related protein, transcribed in the cells of epithelial root sheath. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1996;11(7):892-8.
114. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biology*. 2005;24(2):155-65.
115. Bosshardt DD, Sculean A, Windisch P, Pjetursson BE, Lang NP. Effects of enamel matrix proteins on tissue formation along the roots of human teeth. *Journal of Periodontal Research*. 2005;40(2):158-67.
116. Huang X, Bringas Jr P, Slavkin HC, Chai Y. Fate of HERS during tooth root development. *Developmental Biology*. 2009;334(1):22-30.
117. Yamamoto H, Cho S-W, Kim E-J, Kim J-Y, Fujiwara N, Jung H-S. Developmental Properties of the Hertwig's Epithelial Root Sheath in Mice. *Journal of Dental Research*. 2004 September 1, 2004;83(9):688-92.
118. Suzuki S, Nagano T, Yamakoshi Y, Gomi K, Arai T, Fukae M, et al. Enamel Matrix Derivative Gel Stimulates Signal Transduction of BMP and TGF- β . *Journal of Dental Research*. 2005 June 1, 2005;84(6):510-4.
119. Gestrelus S, Lyngstadaas SP, L. H. Emdogain--periodontal regeneration based on biomimicry. *Clin Oral Investig*. 2000 Jun;4(2):120-5.
120. Cattaneo V, Rota C, Silvestri M, Piacentini C, Forlino A, Gallanti A, et al. Effect of enamel matrix derivative on human periodontal fibroblasts: proliferation, morphology and root surface colonization. An *in vitro* study. *Journal of Periodontal Research*. 2003;38(6):568-74.
121. Narayanan AS IK, Wu D, Pitaru S. Cementum specific components which influence periodontal connective tissue cells. *Connect Tissue Res* 1995;33(1-3):19-21.
122. Alvarez-Pérez MA NS, Zeichner-David M, Rodríguez Carmona B, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone* 2006 Mar;38(3):409-19.
123. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology* 2000. 2000;24(1):99-126.
124. Cho M-I, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontology* 2000. 2000;24(1):9-27.
125. Bartold PM, AS N. Biology of the periodontal connective tissues: Quintessence; 1998.
126. McCulloch CAG, Lekic P, McKee MD. Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. *Periodontology* 2000. 2000;24(1):56-72.
127. Selvig K. The fine structure of human cementum. *Acta Odontol Scand*. 1965 Aug;23(4):423-41.
128. Stern IB. An electron microscopic study of the cementum, Sharpey's fibers and periodontal ligament in the rat incisor. . *Am J Anat*. 1964 Nov;115:377-409.
129. Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontology* 2000. 2000;24(1):28-55.
130. Gao J, Symons AL, Bartold PM. Expression of Transforming Growth Factor-beta 1 (TGF- β 1) in the Developing Periodontium of Rats. *Journal of Dental Research*. 1998 September 1, 1998;77(9):1708-16.
131. Gao J, Symons AL, PM. B. Expression of transforming growth factor-beta receptors types II and III within various cells in the rat periodontium. *J Periodontal Res* 1999 Feb;34(2):113-22.

132. J L Davideau, C Sahlberg, C Blin, P Papagerakis, I Thesleff, Berdal A. Differential expression of the full-length and secreted truncated forms of EGF receptor during formation of dental tissues. *Int J Dev Biol.* 1995;39:605-15.
133. Madan AK, Kramer B. Immunolocalization of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the developing root and supporting structures of the murine tooth. *Journal of Molecular Histology.* 2005;36(3):171-8.
134. Smid JR, Rowland JE, Young WG, Daley TJ, Coschigano KT, Kopchick JJ, et al. Mouse Cellular Cementum is Highly Dependent on Growth Hormone Status. *Journal of Dental Research.* 2004 January 1, 2004;83(1):35-9.
135. Yamashiro T, Tummers M, Thesleff I. Expression of Bone Morphogenetic Proteins and Msx Genes during Root Formation. *Journal of Dental Research.* 2003 March 1, 2003;82(3):172-6.
136. Thomas Åberg, John Wozney, Irma Thesleff. Expression patterns of bone morphogenetic proteins (<I>Bmps</I>) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Developmental Dynamics.* 1997;210(4):383-96.
137. Nakashima M. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. *Arch Oral Biol.* 1994 Dec;39(12):1085-9.
138. Helder MN, Karg H, Bervoets TJM, Vukicevic S, Burger EH, D'Souza RN, et al. Bone Morphogenetic Protein-7 (Osteogenic Protein-1, OP-1) and Tooth Development. *Journal of Dental Research.* 1998 April 1, 1998;77(4):545-54.
139. Ripamonti U. Bone induction by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1, BMP-7) in the primate <i>Papio ursinus</i> with expression of mRNA of gene products of the TGF- β 2; superfamily. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2005;9(4):911-28.
140. Thomadakis G, Ramoshebi LN, Crooks J, Rueger DC, U. R. Immunolocalization of Bone Morphogenetic Protein-2 and -3 and Osteogenic Protein-1 during murine tooth root morphogenesis and in other craniofacial structures. *Eur J Oral Sci.* 1999 Oct;107(5):368-77.
141. Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME, Gamer LW, Agius E, Stevenson SL, et al. Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet.* 2001;27(1):84-8.
142. Cerutis DR, Dreyer AC, Vierra MJ, King JP, Wagner DJ, Fimple JL, et al. Lysophosphatidic Acid Modulates the Healing Responses of Human Periodontal Ligament Fibroblasts and Enhances the Actions of Platelet-Derived Growth Factor. *Journal of Periodontology.* 2007;78(6):1136-45.
143. George J, Headen KV, Ogunleye AO, Perry GA, Wilwerding TM, Parrish LC, et al. Lysophosphatidic Acid Signals Through Specific Lysophosphatidic Acid Receptor Subtypes to Control Key Regenerative Responses of Human Gingival and Periodontal Ligament Fibroblasts. *Journal of Periodontology.* 2009;80(8):1338-47.
144. Cerutis DR, Dreyer A, Cordini F, McVane TP, Mattson JS, Parrish LC, et al. Lysophosphatidic Acid Modulates the Regenerative Responses of Human Gingival Fibroblasts and Enhances the Actions of Platelet-Derived Growth Factor. *Journal of Periodontology.* 2004;75(2):297-305.
145. Gruber R, Kandler B, Jindra C, Watzak G, Watzek G. Dental Pulp Fibroblasts Contain Target Cells for Lysophosphatidic Acid. *Journal of Dental Research.* 2004 June 1, 2004;83(6):491-5.
146. Gaits F, Fourcade O, Le Balle F, Gueguen G, Gaige B, Gassama-Diagne A, et al. Lysophosphatidic acid as a phospholipid mediator: pathways of synthesis. *FEBS Lett.* 1997 Jun 23;410(1):54-8.

147. Moolenaar WH. LPA: a novel lipid mediator with diverse biological actions. *Trends in Cell Biology*. 1994;4(6):213-9.
148. Moolenaar WH. Lysophosphatidic Acid, a Multifunctional Phospholipid Messenger. *Journal of Biological Chemistry*. 1995 June 2, 1995;270(22):12949-52.
149. Saulnier-Blache J. [Lysophosphatidic acid: a "bioactive" phospholipid]. *Med Sci (Paris)*. 2004 Aug-Sep;20(8-9):799-803.
150. Ishii S, Noguchi K, Yanagida K. Non-Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2009;89(3-4):57-65.
151. Valet P, Pagès C, Jeanneton O, Daviaud D, Barbe P, Record M, et al. Alpha2-adrenergic receptor-mediated release of lysophosphatidic acid by adipocytes. A paracrine signal for preadipocyte growth. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998;101(7):1431-8.
152. Fukushima N, Chun J. The LPA receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2001 Apr;64(1-4):21-32.
153. Nakane S, Oka S, Arai S, Waku K, Ishima Y, Tokumura A, et al. 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphate, an arachidonic acid-containing lysophosphatidic acid: occurrence and rapid enzymatic conversion to 2-arachidonoyl-sn-glycerol, a cannabinoid receptor ligand, in rat brain. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002;402(1):51-8.
154. Pagès C, Simon MF, Valet P, JS. S-B. Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2001 Apr;64(1-4):1-10.
155. Anliker B, Chun J. Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Semin Cell Dev Biol*. 2004 Oct;15(5):457-65.
156. Mauco G, Chap H, Simon MF, Douste-Blazy L. Phosphatidic and lysophosphatidic acid production in phospholipase C-and thrombin-treated platelets. Possible involvement of a platelet lipase. *Biochimie*. 1978 Sep 29;60(6-7):653-61.
157. Fourcade O, Simon MF, Viode C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, et al. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell*. 1995 Mar 24;80(6):919-27.
158. Boucharaba A, Guillet B, Menaa F, Hneino M, van Wijnen AJ, Clézardin P, et al. Bioactive lipids lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate mediate breast cancer cell biological functions through distinct mechanisms. *Oncol Res* 2009;18(4):173-84.
159. Ferry G, Tellier E, Try A, Gres S, Naime I, Simon MF, et al. Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem*. 2003 May 16;278(20):18162-9.
160. Peyruchaud O. Novel implications for lysophospholipids, lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate, as drug targets in cancer. *Anticancer Agents Med Chem*. 2009 May;9(4):381-91.
161. Simon MF, Daviaud D, Pradere JP, Gres S, Guigne C, Wabitsch M, et al. Lysophosphatidic acid inhibits adipocyte differentiation via lysophosphatidic acid 1 receptor-dependent down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *J Biol Chem*. 2005 Apr 15;280(15):14656-62.
162. Aoki J, Inoue A, Okudaira S. Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2008;1781(9):513-8.
163. Moolenaar WH. Lysophospholipids in the limelight. *The Journal of Cell Biology*. 2002 July 22, 2002;158(2):197-9.
164. Moolenaar WH, van Meeteren LA, Giepmans BN. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays*. 2004;26(8):870-81.
165. Kishi Y, Okudaira S, Tanaka M, Hama K, Shida D, Kitayama J, et al. Autotaxin Is Overexpressed in Glioblastoma Multiforme and Contributes to Cell Motility of Glioblastoma

- by Converting Lysophosphatidylcholine TO Lysophosphatidic Acid. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 June 23, 2006;281(25):17492-500.
166. Pagès G, Girard A, Jeanneton O, Barbe P, Wolf C, Lafontan M, et al. LPA as a paracrine mediator of adipocyte growth and function. *Ann N Y Acad Sci* 2000 Apr;905:159-64.
 167. David M, Wannecq E, Descotes F, Jansen S, Deux B, Ribeiro J, et al. Cancer Cell Expression of Autotaxin Controls Bone Metastasis Formation in Mouse through Lysophosphatidic Acid-Dependent Activation of Osteoclasts. *PLoS ONE*. 2010;5(3):e9741.
 168. Brindley DN, English D, Pilquil C, Buri K, Ling Z-C. Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2002;1582(1-3):33-44.
 169. Simon M, Rey A, Castan-Laurel I, GrÃ©s S, Sibrac D, Valet P, et al. Expression of Ectolipid Phosphate Phosphohydrolases in 3T3F442A Preadipocytes and Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 June 28, 2002;277(26):23131-6.
 170. Noguchi K, Herr D, Mutoh T, Chun J. Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Curr Opin Pharmacol*. 2009 Feb;9(1):15-23.
 171. Kranenburg O MW. Ras-MAP kinase signaling by lysophosphatidic acid and other G protein-coupled receptor agonists. *Oncogene*. 2001 Mar 26;20(13):1540-6.
 172. Contos JJ, Ishii I, Chun J. Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol*. 2000 Dec;58(6):1188-96.
 173. Anliker B, Chun J. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*. 2004 May 14;279(20):20555-8.
 174. Choi JW, Lee CW, Chun J. Biological roles of lysophospholipid receptors revealed by genetic null mice: an update. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Sep;1781(9):531-9.
 175. Fukushima N, Kimura Y, Chun J. A single receptor encoded by vzg-1/lpA1/edg-2 couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 26;95(11):6151-6.
 176. Ishii I, Contos JJ, Fukushima N, Chun J. Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors, LP(A1)/VZG-1/EDG-2, LP(A2)/EDG-4, and LP(A3)/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system. *Mol Pharmacol*. 2000 Nov;58(5):895-902.
 177. Inoue M, Rashid MH, Fujita R, Contos JJ, Chun J, Ueda H. Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat Med*. 2004 Jul;10(7):712-8.
 178. Harrison SM, Reavill C, Brown G, Brown JT, Cluderay JE, Crook B, et al. LPA1 receptor-deficient mice have phenotypic changes observed in psychiatric disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2003;24(4):1170-9.
 179. Murph MM, Nguyen GH, Radhakrishna H, Mills GB. Sharpening the edges of understanding the structure/function of the LPA1 receptor: Expression in cancer and mechanisms of regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2008;1781(9):547-57.
 180. Pradere JP, Klein J, Gres S, Guigne C, Neau E, Valet P, et al. LPA1 receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Dec;18(12):3110-8.
 181. Tager AM, LaCamera P, Shea BS, Campanella GS, Selman M, Zhao Z, et al. The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med*. 2008 Jan;14(1):45-54.
 182. Contos JJ, Chun J. Complete cDNA sequence, genomic structure, and chromosomal localization of the LPA receptor gene, lpA1/vzg-1/Gpcr26. *Genomics*. 1998 Aug 1;51(3):364-78.
 183. An S, Dickens MA, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ. Molecular Cloning of the Human Edg2 Protein and Its Identification as a Functional Cellular Receptor for

- Lysophosphatidic Acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997;231(3):619-22.
184. Contos JJ, Ishii I, Fukushima N, Kingsbury MA, Ye X, Kawamura S, et al. Characterization of lpa(2) (Edg4) and lpa(1)/lpa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to lpa(2). *Mol Cell Biol*. 2002 Oct;22(19):6921-9.
 185. Bandoh K, Aoki J, Hosono H, Kobayashi S, Kobayashi T, Murakami-Murofushi K, et al. Molecular Cloning and Characterization of a Novel Human G-protein-coupled Receptor, EDG7, for Lysophosphatidic Acid. *Journal of Biological Chemistry*. 1999 September 24, 1999;274(39):27776-85.
 186. Chun J, Weiner JA, Fukushima N, Contos JJ, Zhang G, Kimura Y, et al. Neurobiology of receptor-mediated lysophospholipid signaling. From the first lysophospholipid receptor to roles in nervous system function and development. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 Apr;905:110-7.
 187. Ye X, Hama K, Contos JJ, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, et al. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature*. 2005 May 5;435(7038):104-8.
 188. Noguchi K, Ishii S, Shimizu T. Identification of p2y9/GPR23 as a Novel G Protein-coupled Receptor for Lysophosphatidic Acid, Structurally Distant from the Edg Family. *Journal of Biological Chemistry*. 2003 July 11, 2003;278(28):25600-6.
 189. Pamuklar Z, Lee JS, Cheng H-Y, Panchatcharam M, Steinhubl S, Morris AJ, et al. Individual Heterogeneity in Platelet Response to Lysophosphatidic Acid: Evidence for a Novel Inhibitory Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 March 1, 2008;28(3):555-61.
 190. Yanagida K, Ishii S, Hamano F, Noguchi K, Shimizu T. LPA4/p2y9/GPR23 Mediates Rho-dependent Morphological Changes in a Rat Neuronal Cell Line. *Journal of Biological Chemistry*. 2007 February 23, 2007;282(8):5814-24.
 191. Sumida H, Noguchi K, Kihara Y, Abe M, Yanagida K, Hamano F, et al. LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood*. August 16, 2010;blood-2010-03-272443.
 192. Yanagida K, Masago K, Nakanishi H, Kihara Y, Hamano F, Tajima Y, et al. Identification and Characterization of a Novel Lysophosphatidic Acid Receptor, p2y5/LPA6. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 June 26, 2009;284(26):17731-41.
 193. Murakami M, Shiraishi A, Tabata K, Fujita N. Identification of the orphan GPCR, P2Y10 receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;371(4):707-12.
 194. Tabata K-i, Baba K, Shiraishi A, Ito M, Fujita N. The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;363(3):861-6.
 195. Saba JD. Lysophospholipids in development: Miles apart and edging in. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2004;92(5):967-92.
 196. Moolenaar WH. Bioactive Lysophospholipids and Their G Protein-Coupled Receptors. *Experimental Cell Research*. 1999;253(1):230-8.
 197. Gardell SE, Dubin AE, Chun J. Emerging medicinal roles for lysophospholipid signaling. *Trends Mol Med*. 2006 Feb;12(2):65-75.
 198. Gennero I, Xuereb J-M, Simon M-F, Girolami J-P, Bascands J-L, Chap H, et al. Effects of Lysophosphatidic Acid on Proliferation and Cytosolic Ca⁺⁺ of Human Adult Vascular Smooth Muscle Cells in Culture. *Thrombosis Research*. 1999;94(5):317-26.
 199. Karliner JS. Mechanisms of cardioprotection by lysophospholipids. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2004;92(6):1095-103.
 200. Kanczler JM, Ginty PJ, White L, Clarke NMP, Howdle SM, Shakesheff KM, et al. The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenic

- protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials*. 2010;31(6):1242-50.
201. Dai J, Rabie ABM. VEGF: an Essential Mediator of Both Angiogenesis and Endochondral Ossification. *Journal of Dental Research*. 2007 October 1, 2007;86(10):937-50.
 202. Siess W, Zangl KJ, Essler M, Bauer M, Brandl R, Corrinth C, et al. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999 June 8, 1999;96(12):6931-6.
 203. Gaits F, Salles JP, H. C. Dual effect of lysophosphatidic acid on proliferation of glomerular mesangial cells. *Kidney Int*. 1997 Apr;51(4):1022-7.
 204. Mitchell A Watsky, May Griffith, De-An Wang, Tigyi GJ. Phospholipid Growth Factors and Corneal Wound Healing. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;905(LYSOPHOSPHOLIPIDS AND EICOSANOIDS IN BIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY):142-58.
 205. Mazereeuw-Hautier J, Gres S, Fanguin M, Cariven C, Fauvel J, Perret B, et al. Production of lysophosphatidic acid in blister fluid: involvement of a lysophospholipase D activity. *J Invest Dermatol* 2005 Sep;125(3):421-7.
 206. Tokumura A, Kanaya Y, Miyake M, Yamano S, Irahara M, Fukuzawa K. Increased Production of Bioactive Lysophosphatidic Acid by Serum Lysophospholipase D in Human Pregnancy. *Biology of Reproduction*. 2002 November 2002;67(5):1386-92.
 207. Ye X, Chun J. Lysophosphatidic acid (LPA) signaling in vertebrate reproduction. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2010;21(1):17-24.
 208. Karliner JS. Lysophospholipids and the cardiovascular system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2002;1582(1-3):216-21.
 209. Fang X, Schummer M, Mao M, Yu S, Tabassam FH, Swaby R, et al. Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2002;1582(1-3):257-64.
 210. Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech Dev*. 2005 Feb;80(2):159-70.
 211. Facchini A, Borzi RM, Flamigni F. Induction of ornithine decarboxylase in T/C-28a2 chondrocytes by lysophosphatidic acid: Signaling pathway and inhibition of cell proliferation. *FEBS Letters*. 2005;579(13):2919-25.
 212. Boyan BD, Hurst-Kennedy J, Denison TA, Schwartz Z. 24R,25-Dihydroxyvitamin D3 [24R,25(OH)2D3] controls growth plate development by inhibiting apoptosis in the reserve zone and stimulating response to 1[alpha],25(OH)2D3 in hypertrophic cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2010;In Press, Corrected Proof.
 213. Grey A, Banovic T, Naot D, Hill B, Callon K, Reid I, et al. Lysophosphatidic acid is an osteoblast mitogen whose proliferative actions involve G(i) proteins and protein kinase C, but not P42/44 mitogen-activated protein kinases. *Endocrinology*. 2001 Mar;142(3):1098-106.
 214. Grey A, Chen Q, Callon K, Xu X, Reid IR, Cornish J. The phospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid prevent apoptosis in osteoblastic cells via a signaling pathway involving G(i) proteins and phosphatidylinositol-3 kinase. *Endocrinology*. 2002 Dec;143(12):4755-63.
 215. Masiello LM, Fotos JS, Galileo DS, Karin NJ. Lysophosphatidic acid induces chemotaxis in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Bone*. 2006 Jul;39(1):72-82.
 216. Dziak R, Yang BM, Leung BW, Li S, Marzec N, Margarone J, et al. Effects of sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid on human osteoblastic cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003 Mar;68(3):239-49.

217. Liu YB, Kharode Y, Bodine PV, Yaworsky PJ, Robinson JA, Billiard J. LPA induces osteoblast differentiation through interplay of two receptors: LPA1 and LPA4. *J Cell Biochem* 2010 Mar;109(4):794-800.
218. Gidley J, Openshaw S, Pring ET, Sale S, Mansell JP. Lysophosphatidic acid cooperates with 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ in stimulating human MG63 osteoblast maturation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2006 Jul;80(1-2):46-61.
219. Karagiosis SA, Karin NJ. Lysophosphatidic acid induces osteocyte dendrite outgrowth. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 May 25;357(1):194-9.
220. Aki Y, Kondo A, Nakamura H, Togari A. Lysophosphatidic acid-stimulated interleukin-6 and -8 synthesis through LPA1 receptors on human osteoblasts. *Arch Oral Biol*. 2008 Mar;53(3):207-13.
221. Cheng R, Cheng L, Shao M-y, Yang H, Wang F-m, Hu T, et al. Roles of lysophosphatidic acid and the Rho-associated kinase pathway in the migration of dental pulp cells. *Experimental Cell Research*. 2010;316(6):1019-27.
222. Grzesik WJ, Kuzentsov SA, Uzawa K, Mankani M, Robey PG, Yamauchi M. Normal Human Cementum-Derived Cells: Isolation, Clonal Expansion, and In Vitro and In Vivo Characterization. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1998;13(10):1547-54.
223. D'Errico JA, Ouyang H, Berry JE, MacNeil RL, Strayhorn C, Imperiale MJ, et al. Immortalized cementoblasts and periodontal ligament cells in culture. *Bone*. 1999;25(1):39-47.
224. Birgbauer E, Chun J. New developments in the biological functions of lysophospholipids. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Dec;63(23):2695-701.
225. Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, et al. International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*. 2002 Jun;54(2):265-9.
226. Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:321-54.
227. Caverzasio J, Palmer G, Suzuki A, Bonjour JP. Evidence for the involvement of two pathways in activation of extracellular signal-regulated kinase (Erk) and cell proliferation by Gi and Gq protein-coupled receptors in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res*. 2000 Sep;15(9):1697-706.
228. Ahmed I, Gesty-Palmer D, Drezner MK, Luttrell LM. Transactivation of the epidermal growth factor receptor mediates parathyroid hormone and prostaglandin F $_2$ α -stimulated mitogen-activated protein kinase activation in cultured transgenic murine osteoblasts. *Mol Endocrinol*. 2003 Aug;17(8):1607-21.
229. Chen F, Capecchi MR. Targeted mutations in *hoxa-9* and *hoxb-9* reveal synergistic interactions. *Dev Biol*. 1997 Jan 15;181(2):186-96.
230. McIntyre DC, Rakshit S, Yallowitz AR, Loken L, Jeannotte L, Capecchi MR, et al. Hox patterning of the vertebrate rib cage. *Development*. 2007 Aug;134(16):2981-9.
231. Abe M, Michikami I, Fukushi T, Abe A, Maeda Y, Ooshima T, et al. Hand2 regulates chondrogenesis in vitro and in vivo. *Bone*. 2010;46(5):1359-68.
232. Boskey AL, Goldberg M, Ashok K, Santiago G. Infrared imaging microscopy of bone: Illustrations from a mouse model of Fabry disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006;1758:942-7.
233. Chang MC, Tanaka J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. *Biomaterials* 2002;23:4811-8.
234. Grey A, Xu X, Hill B, Watson M, Callon K, Reid IR, et al. Osteoblastic cells express phospholipid receptors and phosphatases and proliferate in response to sphingosine-1-phosphate. *Calcif Tissue Int*. 2004 Jun;74(6):542-50.

235. Oreffo ROC, Lashbrooke B, Roach HI, Clarke NMP, Cooper C. Maternal protein deficiency affects mesenchymal stem cell activity in the developing offspring. *Bone*. 2003;33(1):100-7.
236. Gafni RI, McCarthy EF, Hatcher T, Meyers JL, Inoue N, Reddy C, et al. Recovery from osteoporosis through skeletal growth: early bone mass acquisition has little effect on adult bone density. *FASEB J*. 2002 March 26, 2002:01-0640fje.
237. Choi J, Herr D, Noguchi K, Yung Y, Lee C, Mutoh T, et al. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50:157-86.
238. Peng J, Bencsik M, Louie A, Lu W, Millard S, Nguyen P, et al. Conditional expression of a Gi-coupled receptor in osteoblasts results in trabecular osteopenia. *Endocrinology*. 2008 Mar;149(3):1329-37.
239. Boukpepsi T, Septier D, Bagga S, Garabedian M, Goldberg M, Chaussain-Miller C. Dentin Alteration of Deciduous Teeth in Human Hypophosphatemic Rickets. *Calcified Tissue International*. 2006;79(5):294-300.
240. Chaussain-Miller C, Sinding C, Wolikow M, Lasfargues J-J, Godeau G, Garabédian M. Dental abnormalities in patients with familial hypophosphatemic vitamin D-resistant rickets: Prevention by early treatment with 1-hydroxyvitamin D. *The Journal of Pediatrics*. 2003;142(3):324-31.

ANNEXE

Localization of STRO-1, BMP-2/-3/-7, BMP receptors and phosphorylated Smad-1 during the formation of mouse periodontium

P. Kémoun^{a,b,c}, S. Laurencin-Dalicieux^{a,b,c}, J. Rue^{a,b}, F. Vaysse^{b,d}, A. Roméas^e,
H. Arzate^f, F. Conte-Auriol^{c,g}, J.C. Farges^e, J.P. Salles^{b,c,g}, G. Brunel^{a,b,*}

^a Department of Oral Biology, Faculty of Odontology, 3 chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse Cedex, France

^b Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse F-31400, France

^c INSERM, U563, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse F-31300, France

^d Department of Pedodontics, Faculty of Odontology, 3 chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse, France

^e Laboratory "Development and Regeneration of Dental Tissues", INSERM ERI16, EA 1892, IFR62, Faculty of Odontology, University Lyon1, Rue Guillaume Paradin, 69372 LYON Cedex 08, France

^f Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de odontología, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacan 04510 DF, Mexico

^g CHU Toulouse, Unité d'Endocrinologie Maladies Osseuses, Hôpital des Enfants, CHU de Toulouse F-31300, France

Available online 26 July 2007

Abstract

Bone morphogenetic proteins (BMPs) and BMP receptors (BMPRs) are known to regulate the development of calcified tissues by directing mesenchymal precursor cells differentiation. However, their role in the formation of tooth-supporting tissues remains unclear. We investigated the distribution pattern of STRO-1, a marker of mesenchymal progenitor cells and several members of the BMP pathway during the development of mouse molar periodontium, from the post-natal days 6 to 23 (D6 to D23). STRO-1 was mainly localized in the dental follicle (DF) at D6 and D13 then in the periodontal ligament (PDL) at D23. BMP-2 and -7 were detected in Hertwig's epithelial root sheath (HERS) and in DF, then later in differentiated periodontal cells. BMP-3 was detected after D13 of the periodontal development. BMPRs-Ib, -II, the activin receptor-1 (ActR-1) and the phosphorylated Smad1 were detected in DF and HERS at D6 and later more diffusely in the periodontium. BMPR-1a detection was restricted to alveolar bone. These findings were in agreement with others data obtained with mouse immortalized DF cells. These results suggest that STRO-1 positive DF cells may be target of BMPs secreted by HERS. BMP-3 might be involved in the arrest of this process by inhibiting the signaling provided by cementogenic and osteogenic BMPs.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Bone morphogenetic protein; Mesenchymal cells; Precursor cells; Hertwig's epithelial root sheath; Dental follicle

1. Introduction

Mesenchymal cell precursors with multipotential properties have been localized in the periodontal ligament (PDL) in humans (Seo et al., 2004). These cells express STRO-1, a cell surface antigen characteristic of mesenchymal progenitor cells present in bone marrow (Simmons et al., 1994) and may differentiate into highly specialized periodontal cells (Seo et al., 2004). The dental follicle (DF) surrounding the

developing tooth germ is an ectomesenchymal tissue composed of heterogeneous cell populations derived from the cranial neural crest which also include periodontal precursors (Morscizek et al., 2005; Ivanovski et al., 2006; Kémoun et al., 2007). Although their capacity to differentiate into various cell types including osteoblasts and/or cementoblasts has also been demonstrated (Hakki et al., 2001; Zhao et al., 2002; Luan et al., 2006), expression of STRO-1 by mouse DF cells has never been investigated.

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are involved in the development of numerous skeletal and extra-skeletal organs and tissues in vertebrates (Chen et al., 2004). BMP-2 and -7 induce rodent mesenchymal cells to differentiate into osteoblasts (Zhu et al., 2004), while BMP-3 down-regulates

* Corresponding author at: Department of Oral Biology, Faculty of Odontology, Paul Sabatier University, 3 chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse Cedex, France. Tel.: +33 5 62 17 36 09; fax: +33 5 61 25 47 19.

E-mail address: brunel@cict.fr (G. Brunel).

bone mineralization and density (Daluiski et al., 2001). In monkeys, BMP-2 and -7 also stimulate cementogenesis during periodontium formation (Taba et al., 2005). In-vitro experiments have shown that BMP-2 induces mouse DF cells to differentiate towards the osteo-cementoblastic phenotype (Zhao et al., 2002). Enamel matrix derivative (EMD), immature enamel extracts from porcine teeth used in periodontal regenerative therapies, contain BMP-2 and -7 (Takayama et al., 2005) and enhance the expression of CP-23, a marker of cementoblastic differentiation (Alvarez-Perez et al., 2006) by human dental follicle cells (Kémoun et al., 2007).

Several members of the BMP family have been localized during the development of mouse periodontium (Helder et al., 1998; Thomadakis et al., 1999; Yamashiro et al., 2003; Yamamoto et al., 2004). BMP-2, -3 and -7 have been detected in periodontal tissues from post-natal day 12 to 18 (Thomadakis et al., 1999) and BMP-3 transcripts were detected in DF cells, cementoblasts and alveolar osteoblasts (Yamashiro et al., 2003). However, some discrepancies remain regarding the localization of BMPs during periodontium development.

BMPs activate target cells by binding to type-Ia, -Ib and -II BMP receptors (BMPR), and to the activin receptor-1 (ActR-1) (Chen et al., 2004). These transmembrane receptors recruit and phosphorylate cytoplasmic proteins, especially the receptor-regulated signal transducers Smads 1, 5 and 8. Once phosphorylated, Smads bind to specific partners, translocate to the nucleus and up-regulate specific genes (Chen et al., 2004).

The aim of this study was to localize by immunohistochemistry STRO-1, BMPs, BMPRs and phosphorylated Smad1 (pSmad1) during initial, intermediate and late stages of mouse periodontium formation at day 6, 13 and 23 (D6, D13, D23). These results demonstrate, for the first time to our knowledge, the presence of STRO-1 positive cells in mouse DF, in which BMPR-Ib, -II, ActR-1 and pSmad1 were also detected. In addition, immunofluorescence and FACS analysis performed with immortalized mouse DF cells isolated from the first lower molar at D6 confirmed the expression of BMPRs by STRO-1 positive cells. CP-23 expression by DF cells was detected under EMD treatment and was partially inhibited by Noggin, a BMP antagonist. These results suggest that immortalized mouse DF cells may differentiate toward a cementoblastic phenotype, dependent on BMP-pathways. Furthermore, BMP-2 and -7 were strongly detected in HERS at early stages of tooth development. Altogether, these data suggest that STRO-1 positive DF cells are periodontal progenitor cells target of BMPs expressed by HERS.

2. Materials and methods

2.1. Materials

EMD gel was obtained from Straumann (Basel, Switzerland). Recombinant Noggin was purchased from R&D

System Inc. (Minneapolis, MN, USA). The anti-STRO-1 monoclonal antibody (IgM) was purchased from the Developmental Hybridoma Study Bank (Iowa City, USA). Goat polyclonal antibodies against BMP-2 and -7 were from SantaCruz Biotechnologies Inc. (SantaCruz, USA). Goat polyclonal antibody against BMP-3 was from R and D Systems (R and D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA). Rabbit polyclonal antibodies that can recognize pSmad1 and both cell membrane localization and an intra-cellular expression of BMP receptors (BMPR-Ia, -Ib and -II and ActR-1) were a kind gift from Drs C.H. Heldin and P. TenDijke (Heldin et al., 1997; Rosendahl et al., 2002). The rabbit polyclonal antibody against cementum protein-23 (CP-23) was previously described (Alvarez-Perez et al., 2006). Dulbecco modified eagle medium (DMEM) was from Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA). Slide chambers were from Nalge Nunc Int (Rochester, NY, USA). Vectastain Elite ABC Kit, M.O.M kit and DAB Substrate Kit was from Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA). Zenon Rabbit labeling kit Alexa Fluor 647, AlexaFluor 633 goat anti-rabbit IgG, penicillin and streptomycin were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Isotype-matched control antibodies were from Serotec (Cergy Saint-Christophe, France). All other materials were from Sigma (St Louis, MO, USA).

2.2. Tissue preparation

Twelve mouse pups (breed ICR CD-1) from D6, 13 and 23 (four per time-point) were decapitated after cervical dislocation according to the European Animal Ethics Committee. Heads were fixed in 3.7% paraformaldehyde (pH 7.0) for 2 to 4 days. Hemi-mandibles were separated and decalcified in 10% EDTA for 6–10 days. Tissues were then dehydrated through graded ethanol series, embedded in paraffin and 4- μ m-thick sections were performed.

2.3. Cell cultures

Mouse DF cells were obtained from first lower molars of D6 mice and cultured as described previously (Zhao et al., 2002). Briefly, tooth germs were removed under a dissecting microscope and subjected to enzymatic digestion (0.6 mg/mL of collagenase A and 0.25% (v/v) trypsin) in DMEM for 1 h, at 37 °C. The suspension was centrifuged at 1000 rpm for 5 min. Cellular pellets were resuspended and cultured in DMEM supplemented with 100 U/mL penicillin and 100 ng/mL streptomycin (i.e.: basal medium) containing 10% (v/v) FCS, at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. In order to obtain viable material for coverglass culture and confocal microscopy analysis, mouse DF primary cells were immortalized in the presence of pAS, a plasmid encoding the early functions of SV40 as previously described (Chatelut et al., 1998). Cells were considered immortalized when their proliferation rate was 10-fold that of non-immortalized cells. Immortalized mouse DF cells were

maintained in basal medium supplemented with 10% FCS in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C.

2.4. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed using an immunoperoxidase method using Vectastain Elite ABC M.O.M. kit. The biotinylated anti-mouse IgG was replaced by a biotinylated anti-mouse IgM for STRO-1 detection. After paraffin removal in xylene and descending ethanol series, sections were incubated with 3% H₂O₂ solution for 5 min to neutralize endogenous peroxidase activity. After washing with phosphate buffered saline (PBS) plus 2% (w/v) bovine serum albumin (BSA), non-specific sites were saturated using the blocking solution supplied with the kit. After overnight incubation at 4 °C with primary antibodies (dilution 1:1 for anti-STRO-1, 1:50 for all others except 1:100 for anti pSmad-1) in an antibody diluent solution with background reduction and repeated washing, sections were treated with appropriate biotinylated secondary antibody 1 h at room temperature (RT) and avidin-peroxidase conjugate 30 min at RT according to the manufacturer's instructions. Samples were then washed and incubated with a solution of 3,3'-diaminobenzidine from the Vector DAB Substrate Kit for Peroxidase for 1.5 min. Sections were counterstained with toluidine blue. Some sections were also stained with Masson's trichrome in order to identify anatomical structures. Primary antibodies were omitted in negative controls. Bone skull, bone-marrow and salivary gland sections were used as positive controls. Slides were submitted to blind scoring by two independent observers using a Leica microscope and photographed with a Nikon Coolpix 4500.

2.5. Cell differentiation

Immortalized mouse DF cells were seeded into six culture wells at a density of 10⁵ cells/well and cultured in basal medium with 10% (v/v) FCS until confluence, then maintained in basal medium or differentiation medium (basal medium with 1% (v/v) FCS, 50 µg/mL L-ascorbate 2-phosphate) and agonists as following: EMD (50 µg/mL), Noggin (500 ng/mL) or vehicle (PBS) for 12 days. Cells were used for immunofluorescence, and FACS analysis as described below.

2.6. Immunofluorescence

Immortalized mouse DF cells were seeded on glass slide chambers (10⁴ cells per 0.8 cm²). After culture for 2 additional days, cells were washed three times in PBS and fixed in 3.7% paraformaldehyde for 15 min at RT. Saturation was performed in PBS plus 1% (w/v) BSA for 30 min at RT followed by cell permeabilization with 0.2% (v/v) triton X-100 in PBS, 2 min for cytosolic protein detection. Cells were then incubated with primary antibodies diluted in PBS plus 1%

(w/v) BSA dilution 1:200 (except CP-23, 1:1000 and undiluted anti-STRO-1 antibody) for 1 h at 4 °C. After washing with PBS, cells were incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse IgM, and/or AlexaFluor 633 goat anti-rabbit IgG (dilution 1:400) for 1 h. Cell nuclei were stained by LO-PRO1 (dilution 1:500) for 5 min then preparations were immediately visualized. Primary antibodies were omitted in negative controls. Experiments were performed three times with similar results. Sections were visualized by confocal microscopy (Zeiss LSM 510, Argon 488 nm, HeNe 543 nm and HeNe 633 nm).

2.7. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis

For cell surface antigen detection, immortalized mouse DF cells were detached with 0.5% trypsin and 10⁵ cells were incubated with STRO-1, BMPR (dilution 1:2 and 1:200, respectively) or isotype-matched control antibodies for 1 h at 4 °C in FACS buffer (PBS containing 1% (w/v) BSA and 0.01% (w/v) sodium azide) followed by incubation with secondary antibodies for 30 min after several washes in FACS buffer.

For CP-23 detection, antibodies was directly labeled with Zenon Rabbit labeling kit Alexa Fluor 647 as previously described (Bradford et al., 2004). After detaching in 0.5% (v/v) trypsin, 10⁵ cells were first fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde for 10 min then incubated in permeabilization buffer (FACS buffer with 0.5% (w/v) saponin) for 30 min. After washing, cells were submitted to Alexa Fluor 647 conjugated CP-23 (1:1000) or isotype-matched control antibodies for 1 h at RT then washed three times in FACS buffer. Cells were resuspended in FACS buffer prior tests. Analysis of 5000 events was performed in a FAC-Scalibur (Becton Dickinson). The regions were set to the reactivity levels obtained with the isotype-matched negative control antibodies (under 1% of fluorescence intensity). Experiments were made at three times three times with similar results. Data were analyzed by the WinMDI 2.9 version software.

3. Results

3.1. Immunolocalization of STRO-1, BMPs, BMPRs and pSmad1 during the formation of mouse periodontium

At D6, DF cells can be localized between the mandibular bone and HERS that elongated at the apical part of the tooth germ to separate the mesenchymal dental papilla (MP) and the DF (Fig. 1a and b). The STRO-1 antigen was mainly detected in DF cells but not in HERS cells (Fig. 1c and c'). A strong staining was observed with anti-BMP-2 and -7 antibodies of HERS and bone cells while some DF cells were only slightly reactive (Fig. 1d, d' and e, respectively). BMP-3 was only detected in bone cells (Fig. 1f). Reactivity for ActR-I, BMPR-Ib and -II antibodies was detected in HERS,

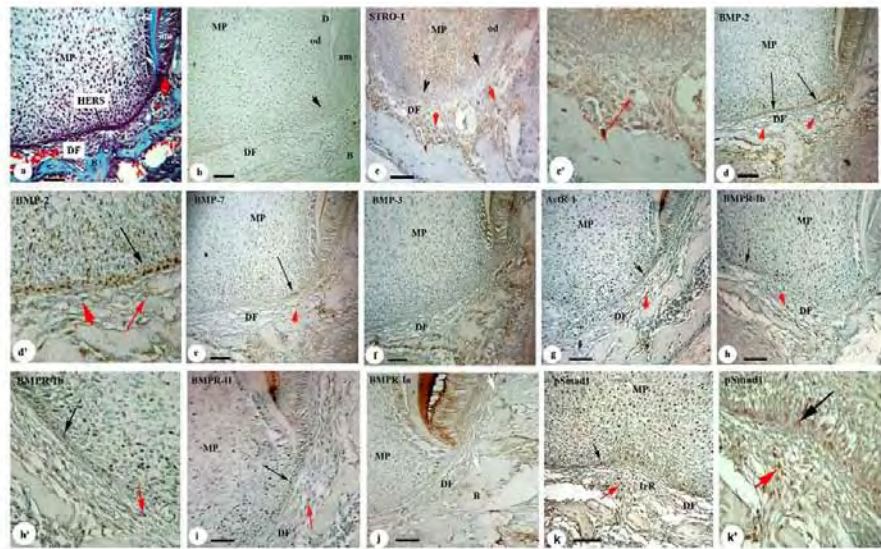


Fig. 1. Immunolocalization of STRO-1, BMPs, BMPRs and pSmad1 at the beginning of mouse molar periodontal development post-natal day 6. (a) Apical part of mouse first lower molar tooth germ. Hertwig's epithelial root sheath (HERS) separates the mesenchymal dental papilla (MP) and the dental follicle (DF). (b) Negative control without primary antibody. (c) The anti-STRO-1 antibody stained DF cells (c' detail of c. $\times 250$). (d–f) BMP-2 (d–d' detail of d. $\times 250$), and BMP-7 (e), but not BMP-3 (f), were detected in HERS cells and DF cells. (g–j) ActR-1 (g), BMPR-Ib (h–h' detail of h. $\times 250$) and BMPR-II (i), were localized in bone, HERS and DF cells while BMPR-Ia was restricted to bone cells (j, white arrows). (k) Bone, HERS and DF cells were immunoreactive against pSmad1 antibody (k' detail of k. $\times 250$). Black arrows: HERS. Red arrows: immunostained DF cells. D: dentin; od: odontoblasts; am: ameloblasts; B: surrounding bone; IrR: inter-radicular region. Scale bars = 50 μ m.

DF and bone cells (Fig. 1g, h, h' and i, respectively), whereas BMPR-Ia labeling was restricted to bone cells (Fig. 1j). Intracellular staining of pSmad1 was localized in HERS, DF and bone cells (Fig. 1k, k').

At D13, during the development of the cervical part of the root, tooth root lining (TRL) cells (MacNeil et al., 1996) were aligned along the external part of the forming root (Fig. 2a and b). HERS decreased in length while alveolar bone (AB) and PDL began to form. DF cells remained labeled by the anti-STRO-1 antibody (Fig. 2c). BMP-2 and -7 were strongly localized in HERS, DF, AB, PDL and TRL cells (Fig. 2d and e, e') while BMP-3 was only weakly detected in some AB, PDL and TRL cells (Fig. 1f). ActR-1, BMPR-Ib and -II, were mainly localized in HERS, DF, AB, PDL and TRL

cells (Fig. 2g, h, i, and i' respectively) while BMPR-Ia were only detected in some AB cells (Fig. 2j and j'). Staining of pSmad1 was mainly found in HERS, DF, AB, PDL and TRL cells (Fig. 2k and l).

At D23, the root was almost completely developed and the periodontal tissues were in place (Fig. 3a and b). Involution of DF and HERS was almost completely achieved. Staining of STRO-1 was mainly detected in PDL cells even though some bone and TRL cells were also stained (Fig. 3c). AB, PDL and TRL cells were strongly labeled by anti-BMP-2, -3 and -7 antibodies (Fig. 3d, e, f, and f'). Reactivity for ActR-1, BMPRs-Ib, -II, and pSmad1 antibodies was observed in AB, PDL and TRL cells while BMPR-Ia was only detected in AB cells (Fig. 3g–j). Phosphorylated Smad1

Table 1
STRO-1, BMP-2, -3, -7, ActR-1, BMPR-Ia, -Ib, -II and pSmad1 detection during mouse periodontal development

	D6		D13					D23		
	HERS cells	DF cells	HERS cells	DF cells	TRL cells	PDL cells	AB cells	TRL cells	PDL cells	AB cells
STRO-1	—	+++	—	+++	—	—	—	+	+++	+
BMP-2/-7	+++	+	++	++	++	++	++	+++	+++	+++
BMP-3	—	—	—	—	+	+	+	+++	+++	+++
BMPR-Ia	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+
BMPR-Ib, -II, ActR-1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
pSmad1	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Staining intensity has been evaluated and scaled from absence of Staining (—) to weak (+) moderate (++) or strong staining (+++).

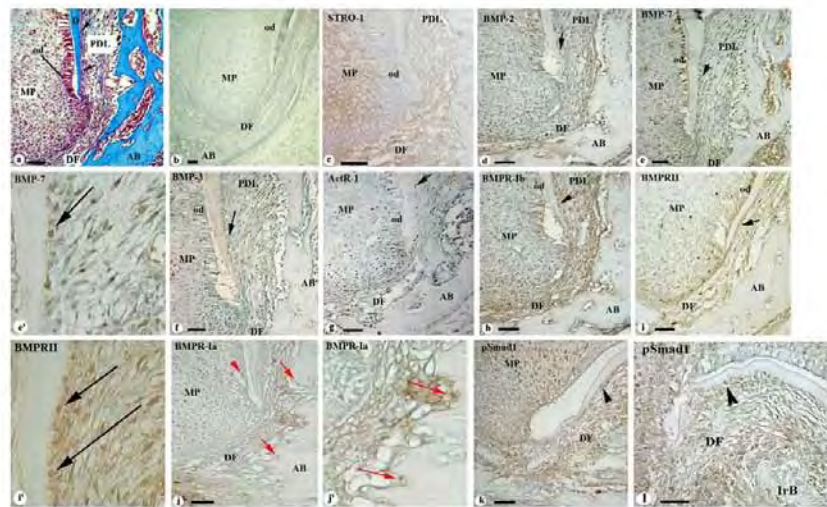


Fig. 2. Immunolocalization of STRO-1, BMPs, BMPRs and pSmad1 at the intermediate stage of mouse developing periodontium post-natal day 13. (a) Periodontium formation around the mouse first lower molar. The cervical third of the root is being formed. Odontoblasts actively deposit dentine (D). The inter-radicular bone develops. Tooth root lining (TRL) cells are aligned along the external part of the root. Hertwig's epithelial root sheath (HERS) decreases in length. Alveolar bone (AB) and periodontal ligament (PDL) begin to form. (b) Negative control without primary antibody. (c) Dental follicle (DF) and mesenchymal dental papilla (MP) cells were immunoreactive against STRO-1 antibody. (d–f) A strong BMP-2 and BMP-7 staining was detected in DF, HERS, TRL, AB and PDL cells (d and e; e' detail of e. $\times 250$), while a weak BMP-3 staining was detected in these cells (f). (g–j) ActR-1, BMPRs-Ib and -II, were mainly localized in DF, HERS, TRL, AB and PDL cells (g, h, i–i' detail of i. $\times 250$) while BMPR-Ia was only present in some AB cells and odontoblasts (red arrows—j; j' detail of j. $\times 250$). (k, l) Phosphorylated Smad1 staining was localized in DF, HERS, TRL, AB and PDL cells. IrB: inter-radicular bone; od: odontoblasts. Black arrows: TRL cells. Scale bars = 50 μ m.

staining remained in AB, PDL and TRL cells (Fig. 3k and l). Results of immunostaining experiments are summarized in Table 1.

Bone and bone-marrow tissues from skull sections were immunoreactive for STRO-1 and BMP-2/-7, BMPRs and pSmad1 antibodies (Chen et al., 2004) (Fig. 4a–h). Control of BMP-3 staining was visualized in sub-mandibular glands (Hardy and Kramer, 2000, Fig. 4i).

3.2. Expression of STRO-1 and BMP receptors in cultured immortalized mouse DF cells

Fig. 5A showed STRO-1 detection in the cell membrane of immortalized mouse DF cells (Fig. 5A. a, d, g, j). Interestingly, STRO-1 positive cells expressed ActR-1, BMPR-Ib, and BMPR-II (Fig. 5A. c, f, i) but not BMPR-Ia (Fig. 5A. l). Human bone-marrow stromal cells and CHO cells were used respectively as positive and negative controls for expression of STRO-1 as described (Stewart et al., 1999) (data not shown). FACS analysis of STRO-1 expression by immortalized mouse DF cell culture showed a mean of 20.45 (1.78) % (mean (S.D.), $n=4$) of positive cells; BMPR-Ib, -II and ActR-1 are expressed by 13.36, 12.64 and 11.42% of STRO-1 positive cells, respectively, while no BMPR-Ia expression was found in cell population (Fig. 5B).

3.3. Immortalized mouse DF cells express the cementoblast marker (CP-23) in the presence of EMD

To investigate the potential of immortalized mouse DF cells to undergo cementoblastic differentiation under BMPs, CP-23 expression was evaluated in EMD stimulated cells with or without Noggin.

Immunofluorescence studies showed that most of immortalized mouse DF cells were immunopositive for CP-23 when stimulated 12 days with EMD (Fig. 6A). Detection of CP-23 was clearly inhibited by Noggin treatment (Fig. 6A).

Quantitative expression of this cementoblastic marker was evaluated by FACS analysis. 85% of EMD-treated cells expressed CP-23. The addition of Noggin in EMD-medium reduced dramatically the percentage of CP-23 positive cells (Fig. 6B).

4. Discussion

In this study we aimed to localize STRO-1, BMP-2,-3,-7, BMPR-Ia, -Ib, II, ActR-1 and pSmad1 proteins by immunohistochemistry at different stages of mouse periodontium formation.

A number of antibodies have been generated that recognize antigens present on stromal progenitor cells (Simmons et

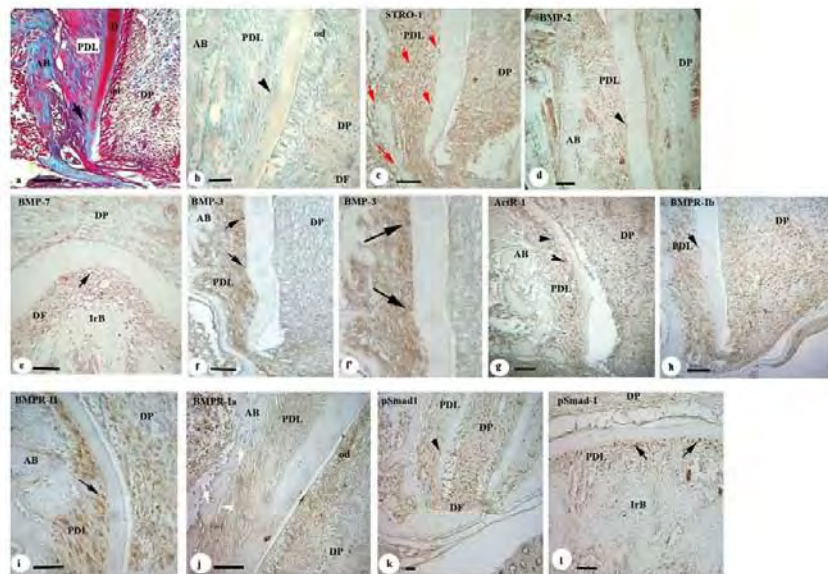


Fig. 3. Immunolocalization of STRO-1, BMPs, BMPRs, and pSmad1 at the end of mouse developing periodontium post-natal day 23. (a) Periodontium development of mouse first lower molar. The root is almost completely formed and the periodontal tissues are in place. Dental follicle and Hertwig's epithelial root sheath are considerably reduced. (b) Negative control without primary antibody. (c) STRO-1 was mainly detected in periodontal ligament (PDL) cells, but some alveolar bone (AB) and tooth root lining (TRL) cells were also stained (red arrows). (d–i) TRL, AB and PDL cells were strongly labeled by anti-BMP-2, -3 and -7 antibodies d–f (f' detail of f. $\times 250$) and ActR-1, BMPRs-Ib, II g–i. (j) BMPR-Ia cannot be detected in these cells except in some AB cells (white arrows). (k–l) Phosphorylated Smad1 was localized in TRL, AB and PDL cells. DP: dental pulp; IrB: inter-radicular bone; D: dentin; od: odontoblasts. Black arrows: TRL cells. Scale bars = 50 μ m.

al., 1994). STRO-1 is a trypsin-resistant cell surface antigen present on both human and mouse primary or immortalized progenitor cells (Stewart et al., 1999). A first important result of this study was the identification of STRO-1 positive cells in DF at the beginning of the formation of mouse periodontium, while reinforcing the recent observation suggesting the mouse DF as a source of precursor cells in the periodontium (Luan et al., 2006), a fact also shown in human (Morscheck et al., 2005; Kémoun et al., 2007). The percent-

age of STRO-1 positive immortalized mouse DF cells is in line with published data concerning BMS-2 cells, a STRO-1 positive mouse cell line (Stewart et al., 1999). However, we showed in our laboratory that human dental follicle cells cultures contain 7% of STRO-1 positive cells (Kémoun et al., 2007). This may indicate that mouse DF contains more STRO-1 positive cells than human DF, however cell selection by immortalization process cannot be excluded. The number of STRO-1 positive cells is in agreement with the

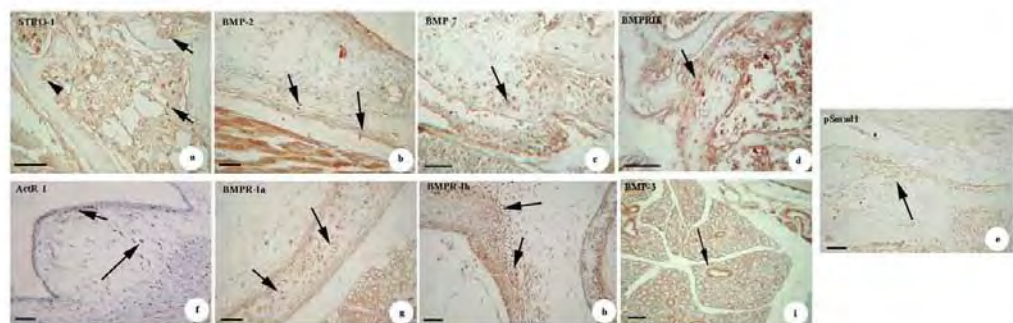


Fig. 4. Immunolocalization of STRO-1, BMPs, BMPRs, and pSmad1 in cranial structures. (a) STRO-1 staining of bone marrow cells in mouse skull base bone. (b–h) BMP-2/-7, BMPRs and pSmad1 staining of bone cells of mouse skull and skull base. (i) BMP-3 positive staining in mouse sub-mandibular gland. (Positive staining shown by black arrows.)

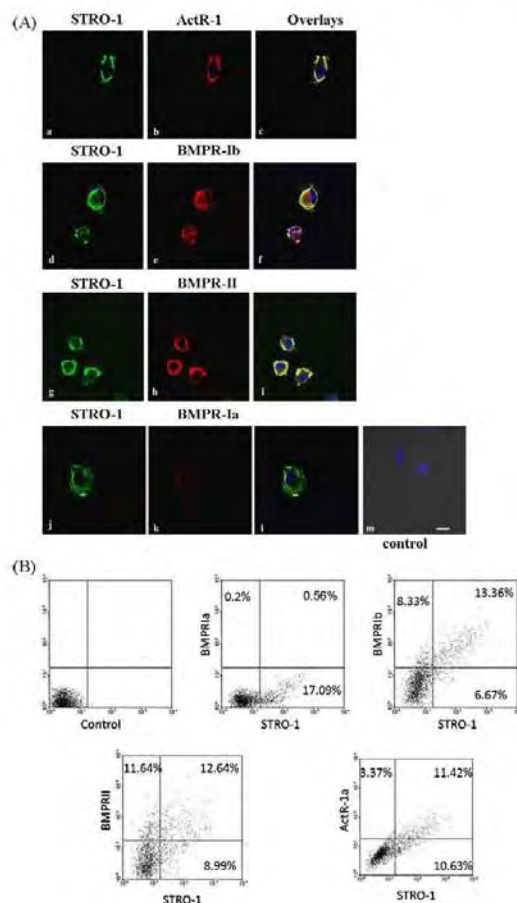


Fig. 5. Expression of BMPs by STRO-1 positive mouse DF cells. (A) Double immunofluorescence of STRO-1/BMP expression by immortalized mouse dental follicle cells. Cells were incubated with primary antibodies against STRO-1 (a, d, g, j) and ActR-1 (b), BMP-1b (e), II (h) or -Ia (k). Staining was visualized with a FITC-conjugated anti-mouse secondary antibody (a, d, g, j) (green) or a Alexafluor 633-conjugated anti-rabbit secondary antibody (b, h, e, k) (red). Nuclei were stained with LO-PRO1 (blue). STRO-1 positive immortalized mouse DF cells expressed ActR-1 (c), BMP-1b (f), BMP-1I (i), but not BMP-1a (l). Control was performed without primary antibody (m). Bar = 10 μ m. (B) FACS analysis of STRO-1 and BMPs expression by immortalized mouse dental follicle cells. Cells were resuspended in STRO-1 supernatant containing an optimized dilution of rabbit antibodies directed against BMPs as indicated. Negative control isotype-matched antibodies were used under identical conditions. Cells incubated with negative control antibody were used to set quadrants with $\geq 99\%$ of events located within the lower left quadrant. The percentage of STRO-1 and BMPs positive cells is given. Results from two representative experiments are shown.

notion as a "niche of mesenchymal stem cells" as defined (Gronthos et al., 2002). Interestingly, STRO-1 positive cells were also localized in MP, as already reported in humans (Shi and Gronthos, 2003).

Later during the formation of the periodontal structures, STRO-1 positive cells were mainly localized in PDL which is in agreement with previous data in humans (Gronthos et al., 2002; Seo et al., 2004; Chen et al., 2006; Ivanovski et al., 2006). In addition, STRO-1 positive cells were localized close to the root and alveolar bone at the end of the periodontium development, while they seem close to PDL vessels in humans (Chen et al., 2006). This finding suggests that a number of putative periodontal precursors may be present in differentiated periodontal tissues. Further investigations are needed to assess the multipotential properties of periodontal mouse STRO-1 positive cells.

Previous studies indicated a crucial role of BMP-pathway molecules during the development of periodontal tissues (Helder et al., 1998; Thomadakis et al., 1999; Zhao et al., 2002; Yamashiro et al., 2003; Yamamoto et al., 2004), although their localization remains largely controversial. Antibodies against BMP-2 and BMP-7 mainly labeled HERS cells at the beginning of the periodontal development while their localization became more diffuse later in the differentiated structures of periodontium. Our results are in agreement with those previously published (Yamashiro et al., 2003; Yamamoto et al., 2004). However, a discrepancy exists with reported results of the localization of BMP-2 in AB after D12 only (Thomadakis et al., 1999). While the reason for such differences is unclear it may be explained by the specificity of antibodies used in the different studies.

An important result of our study was the strong localization of BMP-2 and -7 in HERS observed at D6. Given the known role of BMP-2 and -7 in the differentiation processes (Zhu et al., 2004) their secretion by HERS is not surprising in agreement with the supposed function of HERS as a source of differentiation factors (Hammarstrom et al., 1996; Nakatomi et al., 2006). It is also noticeable that the localization of BMP-2 and -7 remained similar along the temporal and spatial differentiation process of periodontium. Indeed, it has been mentioned by Helder et al. (1998) that BMP-7 deficient mice display normal tooth development. Nonetheless, specific biochemical properties have also been specially attributed to the BMP-2/-7 heterodimer (Zhu et al., 2004). Therefore, even if BMP-2 and -7 expressions seem in some manner redundant during mouse tooth development, synergic effect of the two compounds cannot be formally excluded.

BMP-3 has been extensively investigated in bone formation. Several studies have suggested that BMP-3 down-regulates bone mineralization and density and is an antagonist of osteogenic BMPs (Daluiski et al., 2001). In our study the distribution pattern of BMP-3 was quite different from that of BMP-2 and -7. Unlike BMP-2 and -7, BMP-3 was completely absent from HERS and DF cells. It was slightly detected in some TRL and bone cells at D13 and BMP-3 immunostaining became similar to BMP-2/-7 staining at D23. However, BMP-3 transcripts have been detected after D6 in mouse developing periodontium by others (Yamashiro et al., 2003). Post-transcriptional down regulation of BMP-3 at the early stages of tooth root development may explain these facts.

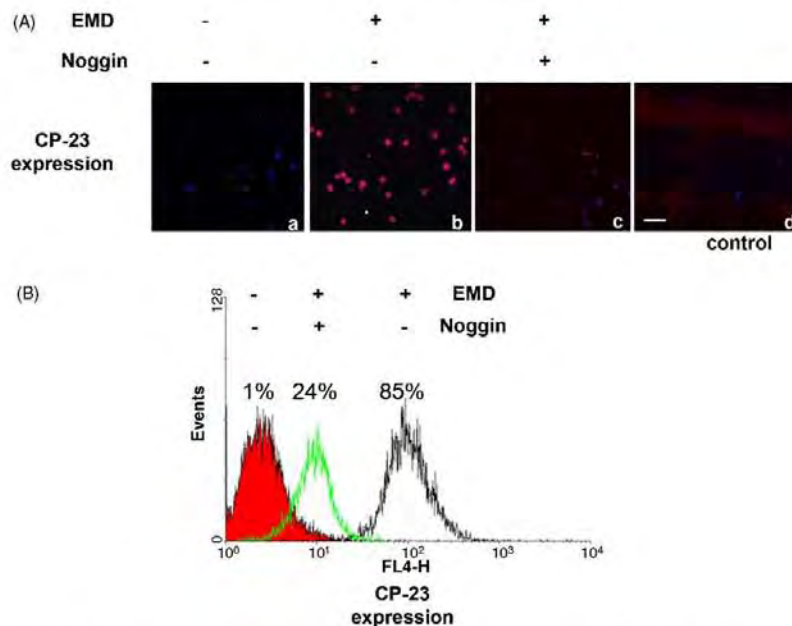


Fig. 6. CP-23 expression in EMD-cultured immortalized mouse DF cells. (A): Cells were stimulated for 12 days with vehicle (a) or EMD with or without Noggin as indicated (b, c). Immunofluorescence assay was performed with antibodies against CP-23 as described. CP-23 was strongly detected in EMD-treated cells (b) compared to other treatments. Negative controls (d) were performed by omitting the primary antibody. Bar = 50 μ m. (B) FACS analysis of CP-23 expression by immortalized mouse dental follicle cells treated for 12 days under EMD with or without Noggin as indicated. They were then incubated with a rabbit anti-CP-23 or isotype-matched Alexa 647 conjugated antibodies. Areas defining CP-23 positive cells on each histogram were set by staining with the negative isotype-matched control antibody (not shown). The percentage of cells CP-23 positive is given. Results from two representative experiments are shown.

Thus, BMP-3 protein, localized only at the latest stages of periodontium formation, might be involved in arrest of this process by inhibiting the signaling provided by other BMPs.

BMPRs and Smad are involved in the differentiation of progenitor cells towards the osteoblast phenotype. BMPRs were recently shown to play a role in the initiation of mouse odontogenesis (Nadiri et al., 2006). We detected BMPR-Ib, -II and ActR-1 proteins in mouse DF cells, in agreement with their potential role as targets of BMPs. This is also supported by the immunolocalization of pSmad1 in DF cells. At this stage HERS labeled by both BMPRs and pSmad-1 antibodies also seems to be target of BMPs. Altogether this suggests the existence of paracrine/autocrine loops between HERS and DF that involve BMPs and BMPRs at this step.

BMPR-Ia was not identified in periodontal DF/differentiated cells at the protein level, except in alveolar bone. However, BMPR-Ia transcripts were detected in cultured mouse DF cells (Zhao et al., 2002). Null mutation of the BMPR-Ia gene causes embryonic lethality in mice (Mishina et al., 1995). A mutation of the gene encoding BMPR-Ia arrests tooth morphogenesis at early step (Andl et al., 2004). Our results showed that BMPR-Ia was slightly expressed during periodontium development. It can thus be suggested, that,

unlike other BMP receptors, BMPR-Ia is marginally involved in the late stages of the tooth formation.

Interestingly, odontoblasts and ameloblasts were found to be labeled by BMPs, BMPR and pSmad-1 antibodies (data not shown). These results confirms previous reports on BMP pathway during crown and pulp root formation (Aberg et al., 1997; Yamashiro et al., 2003; Nadiri et al., 2006).

Finally, the results obtained with cultured mouse DF cells were concordant with those given by immunocytochemistry regarding the detection of STRO-1, BMP-Ib, -II and ActR-1 in mouse DF tissue. Quantitative experiments also demonstrated about 60% of STRO-1 positive DF cells also expressed BMPRs suggesting that these cells are targets of BMPs.

Interestingly, in our study immortalized mouse DF cells retained the ability to differentiate towards the cementoblastic phenotype, as previously suggested (Hakki et al., 2001). When treated 12 days with enamel matrix derivatives proteins (EMD), they expressed the cementoblastic marker CP-23. The addition of Noggin, a BMP antagonist, in EMD medium inhibited the cementoblastic differentiation, suggesting a crucial role in BMPs present in EMD in DF cells differentiation, as previously reported in mouse (Zhao et al., 2002) and human (Kémoun et al., 2007).

In conclusion we detected STRO-1 positive cells in DF at early stages of mouse root development. Except BMPR-1a, localization of BMPRs was also detected in mouse DF and co-expression of STRO-1 and BMPRs was observed in cultured mouse DF cells. It is suggested that DF STRO-1 positive cells are targets of BMPs at this stage. STRO-1 was also detected in PDL at later stages, when the staining of BMPs, BMPR and pSmad1 becomes more diffuse in periodontium. Detection of BMPR-1a was more restricted. BMP-3 immunostaining only found to the late stages of periodontal development suggests its role to down regulate BMP-2/-7-induced signaling at this step. Altogether, these results could indicate that DF may play a role to provide precursor cells when activated by BMP signals elicited by HERS at early steps of periodontium development. Activation of the cytoplasmic protein Smad1 might lead to the expression of specific genes involved in DF cell recruitment and differentiation into periodontal cells. Potentiality of such cells stimulated by BMP-2 and -7 deserves to be investigated in the perspective of periodontal regeneration.

Acknowledgments

We thank Dr P. TenDijke (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands) and Dr CH. Heldin (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden) for providing the BMP receptors and pSmad1 antibodies. The STRO-1 antibody was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (Dr K. Jensen). This antibody was developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242, USA. We thank Pr T. Levade (Laboratoire de Biochimie Métabolique, INSERM U.466, Toulouse, France) for cell immortalization, and ML Calise and S. Apollinaire (Service de Zootechnie, IFR30, Purpan, Toulouse, France) for the kind gift of mouse pups. This work was also supported by grants from the Programme de Recherche Clinique (AOL 0403602) and from the Conseil Régional de Midi-Pyrénées.

References

- Aberg, T., Wozney, J., Thesleff, I., 1997. Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev. Dyn.* 210, 383–396.
- Alvarez-Perez, M.A., Narayanan, S., Zeichner-David, M., Rodríguez Carmona, B., Arzate, H., 2006. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone* 38, 409–419.
- Andl, T., Ahn, K., Kairo, A., Chu, E.Y., Wine-Lee, L., Reddy, S.T., Croft, N.J., Cebra-Thomas, J.A., Metzger, D., Chambon, P., Lyons, K.M., Mishina, Y., Seykora, J.T., Crenshaw III, E.B., Millar, S.E., 2004. Epithelial Bmpr1a regulates differentiation and proliferation in postnatal hair follicles and is essential for tooth development. *Development* 131, 2257–2268.
- Bradford, J.A., Buller, G., Suter, M., Ignatius, M., Beechem, J.M., 2004. Fluorescence-intensity multiplexing: simultaneous seven-marker, two-color immunophenotyping using flow cytometry. *Cytometry A* 61, 142–152.
- Chatelut, M., Caspar-Bauguil, S., Tkaczuk, J., Alibaud, L., Pieraggi, M.T., Roudani, S., Vacaressse, N., Feunteun, J., Laharrague, P., Duchayne, E., Demur, C., Vincent, M.C., Thiers, J.C., Salvayre, R., Levade, T., 1998. Establishment and characterization of a human T-lymphocyte cell line immortalized by SV40 and with abnormal expression of TCR/CD3. *Scand. J. Immunol.* 48, 659–666.
- Chen, D., Zhao, M., Mundy, G.R., 2004. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22, 233–241.
- Chen, S.C., Marino, V., Gronthos, S., Bartold, P.M., 2006. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J. Periodontol. Res.* 41, 547–553.
- Daluisi, A., Engstrand, T., Bahamonde, M.E., Gamer, L.W., Agius, E., Stevenson, S.L., Cox, K., Rosen, V., Lyons, K.M., 2001. Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat. Genet.* 27, 84–88.
- Gronthos, S., Braham, J., Li, W., Fisher, L.W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P.G., Shi, S., 2002. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.* 81, 531–535.
- Hakki, S.S., Berry, J.E., Somerman, M.J., 2001. The effect of enamel matrix protein derivative on follicle cells in vitro. *J. Periodontol.* 72, 679–687.
- Hammarstrom, L., Alati, L., Fong, C.D., 1996. Origins of cementum. *Oral Dis.* 2, 63–69.
- Hardy, G., Kramer, B., 2000. Spatial and temporal localisation of bone morphogenetic protein-3 (osteogenin) in the developing rat submandibular gland. *Sadj* 55, 136–141.
- Helder, M.N., Karg, H., Bervoets, T.J., Vukicevic, S., Burger, E.H., D'Souza, R.N., Woltgens, J.H., Karsenty, G., Bronckers, A.L., 1998. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1, OP-1) and tooth development. *J. Dent. Res.* 77, 545–554.
- Heldin, C.H., Miyazono, K., ten Dijke, P., 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465–471.
- Ivanovski, S., Gronthos, S., Shi, S., Bartold, P.M., 2006. Stem cells in the periodontal ligament. *Oral Dis.* 12, 358–363.
- Kémoun, P., Laurencin-Dalicieux, S., Rue, J., Farges, J.C., Gennero, I., Conte-Auriol, F., et al., 2007. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res.* 329 (2), 283–294.
- Luan, X., Ito, Y., Dangaria, S., Diekwisch, T.G., 2006. Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. *Stem Cells Dev.* 15, 595–608.
- MacNeil, R.L., Berry, J., Strayhorn, C., Somerman, M.J., 1996. Expression of bone sialoprotein mRNA by cells lining the mouse tooth root during cementogenesis. *Arch. Oral Biol.* 41, 827–835.
- Mishina, Y., Suzuki, A., Ueno, N., Behringer, R.R., 1995. Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 9, 3027–3037.
- Morscheck, C., Gotz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kuhn, U., Mohl, C., Sippel, C., Hoffmann, K.H., 2005. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 24, 155–165.
- Nadiri, A., Kuchler-Bopp, S., Perrin-Schmitt, F., Lesot, H., 2006. Expression patterns of BMPRs in the developing mouse molar. *Cell Tissue Res.* 324, 33–40.
- Nakatomi, M., Mouri, I., Eto, K., Ota, M.S., 2006. Sonic hedgehog signaling is important in tooth root development. *J. Dent. Res.* 85, 427–431.
- Rosendahl, A., Pardali, E., Speletas, M., Ten Dijke, P., Heldin, C.H., Sideras, P., 2002. Activation of bone morphogenetic protein/Smad signaling in bronchial epithelial cells during airway inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27, 160–169.
- Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Braham, J., Young, M., Robey, P.G., Wang, C.Y., Shi, S., 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364, 149–155.
- Shi, S., Gronthos, S., 2003. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J. Bone Miner. Res.* 18, 696–704.

- Simmons, P.J., Gronthos, S., Zannettino, A., Ohta, S., Graves, S., 1994. Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis. *Prog. Clin. Biol. Res.* 389, 271–280.
- Stewart, K., Walsh, S., Screen, J., Jefferiss, C.M., Chainey, J., Jordan, G.R., Beresford, J.N., 1999. Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1345–1356.
- Taba Jr., M., Jin, Q., Sugai, J.V., Giannobile, W.V., 2005. Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod. Craniofac. Res.* 8, 292–302.
- Takayama, T., Suzuki, N., Narukawa, M., Tokunaga, T., Otsuka, K., Ito, K., 2005. Enamel matrix derivative stimulates core binding factor alpha1/Runt-related transcription factor-2 expression via activation of Smad1 in C2C12 cells. *J. Periodontol.* 76 (2), 244–249.
- Thomadakis, G., Ramoshebi, L.N., Crooks, J., Rueger, D.C., Ripamonti, U., 1999. Immunolocalization of Bone Morphogenetic Protein-2 and -3 and Osteogenic Protein-1 during murine tooth root morphogenesis and in other craniofacial structures. *Eur. J. Oral Sci.* 107, 368–377.
- Yamamoto, H., Cho, S.W., Kim, E.J., Kim, J.Y., Fujiwara, N., Jung, H.S., 2004. Developmental properties of the Hertwig's epithelial root sheath in mice. *J. Dent. Res.* 83, 688–692.
- Yamashiro, T., Tummers, M., Thesleff, I., 2003. Expression of bone morphogenetic proteins and *Msx* genes during root formation. *J. Dent. Res.* 82, 172–176.
- Zhao, M., Xiao, G., Berry, J.E., Franceschi, R.T., Reddi, A., Somerman, M.J., 2002. Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype. *J. Bone Miner. Res.* 17, 1441–1451.
- Zhu, W., Rawlins, B.A., Boachie-Adjei, O., Myers, E.R., Arimizu, J., Choi, E., Lieberman, J.R., Crystal, R.G., Hidaka, C., 2004. Combined bone morphogenetic protein-2 and -7 gene transfer enhances osteoblastic differentiation and spine fusion in a rodent model. *J. Bone Miner. Res.* 19, 2021–2032.

Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro

Philippe Kémoun · Sara Laurencin-Dalieux ·
Jacqueline Rue · Jean-Christophe Farges ·
Isabelle Gennero · Françoise Conte-Auriol ·
Fabienne Briand-Mesange · Mélanie Gadelorge ·
Higinio Arzate · A. Sampath Narayanan ·
Gérard Brunel · Jean-Pierre Salles

Received: 19 July 2006 / Accepted: 9 February 2007 / Published online: 19 April 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract The dental follicle (DF) surrounding the developing tooth germ is an ectomesenchymal tissue composed of various cell populations derived from the cranial neural crest. Human dental follicle cells (HDFC) are believed to contain precursor cells for cementoblasts, periodontal ligament cells, and osteoblasts. Bone morphogenetic proteins (BMPs) produced by Hertwig's epithelial root sheath or present in enamel matrix derivatives (EMD) seem to be involved in the control of DF cell differentiation, but their precise function remains largely unknown. We report the

immunolocalization of STRO-1 (a marker of multipotential mesenchymal progenitor cells) and BMP receptors (BMPR) in DF in vivo. In culture, HDFC co-express STRO-1/BMPR and exhibit multilineage properties. Incubation with rhBMP-2 and rhBMP-7 or EMD for 24 h increases the expression of BMP-2 and BMP-7 by HDFC. Long-term stimulation of these cells by rhBMP-2 and/or rhBMP-7 or EMD significantly increases alkaline phosphatase activity (AP) and mineralization. Expression of cementum attachment protein (CAP) and cementum protein-23 (CP-23), two putative cementoblast markers, has been detected in EMD-stimulated whole DF and in cultured HDFC stimulated with EMD or BMP-2 and BMP-7. RhNoggin, a BMP antagonist, abolishes AP activity, mineralization, and CAP/CP-23 expression in

This work was supported by grants from the French Program of Hospital Clinical Research (PHRC, AOL 0304602), from the Conseil Régional de Midi Pyrénées (Cell and Gene Therapy Program), and from the Etablissement Français du Sang (Program 2003.02).

P. Kémoun · S. Laurencin-Dalieux · J. Rue · G. Brunel
Laboratory of Oral Biology,
Faculty of Odontology,
University Paul-Sabatier, 3 Chemin des Maraîchers,
31062 Toulouse Cedex, France

J.-C. Farges
Laboratory "Development and Regeneration of Dental Tissues",
INSERM ERI16, EA1892, IFR62, Faculty of Odontology,
University Lyon 1, Rue Guillaume Paradin,
69372 Lyon Cedex 08, France

I. Gennero
Institut Fédératif de Biologie, Clinical Biochemistry,
31059 Toulouse Cedex 9, France

F. Conte-Auriol · J.-P. Salles
Endocrine and Bone Diseases Unit and Growth Research Center,
Children's Hospital,
31059 Toulouse Cedex 9, France

P. Kémoun · S. Laurencin-Dalieux · I. Gennero ·
F. Conte-Auriol · F. Briand-Mesange · J.-P. Salles (✉)
INSERM, U.563, Centre de Physiopathologie de Toulouse
Purpan, University Paul-Sabatier,
31059 Toulouse Cedex 9, France
e-mail: jpsalles@toulouse.inserm.fr

M. Gadelorge
Etablissement Français du Sang Pyrénées-Méditerranée,
75 Rue de Lisieux, 31300 Toulouse, France

H. Arzate
Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de
Odontología, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán
04510 DF, Mexico

A. S. Narayanan
Department of Oral Biology, University of Washington,
Health Science Building, Room B-224, Seattle,
WA 98195, USA

HDFC cultures and the expression of BMP-2 and BMP-7 induced by EMD. Phosphorylation of Smad-1 and MAPK is stimulated by EMD or rhBMP-2. However, rhNoggin blocks only Smad-1 phosphorylation under these conditions. Thus, EMD may activate HDFC toward the cementoblastic phenotype, an effect mainly (but not exclusively) involving both exogenous and endogenous BMP-dependent pathways.

Keywords Dental follicle · Progenitor cell · BMP · CAP · CP-23 · Human

Introduction

Considerable attention has been paid to human dental follicle cells (HDFC) originating from the dental follicle (DF) surrounding the developing tooth germ, because they play a crucial role in the development of cementum, periodontal ligament, and alveolar bone (Bosshardt and Schroeder 1996; Saito et al. 2005). HDFC have been suggested to express precursor cells markers and to differentiate toward mineralized-tissue cells (Morsczeck et al. 2005). To date, the fine mechanisms that regulate the differentiation of mesenchymal precursors into cementoblasts during periodontal development have not been elucidated. Slavkin et al. (1989) have hypothesized that molecules from Hertwig's epithelial root sheath (HERS) are involved in this process. Enamel matrix derivatives (EMD; immature enamel extracts from porcine teeth used in periodontal regenerative therapies) have been proposed to mimic the inductive role of HERS products (Gestrelus et al. 1997; Spahr and Hammarstrom 1999). EMD have recently been shown to induce cementoblast differentiation and periodontal regeneration in vivo (Bosshardt et al. 2005) and are suggested to enhance cell proliferation, migration adhesion, and differentiation in vitro (Gestrelus et al. 1997; Rincon et al. 2005). In addition, EMD increase alkaline phosphatase (AP) activity and matrix mineralization in human periodontal ligament cells and osteoblasts and in rodent bone marrow stromal cells (Van der Pauw et al. 2000; Keila et al. 2004). Furthermore, EMD can regulate mouse follicle cell differentiation toward the osteo-cementoblastic phenotype (Hakki et al. 2001).

EMD are essentially composed of amelogenins, which are enamel matrix proteins shown to have growth factor-like activity (Veis et al. 2000). Recently, the osteogenic activity of EMD has been suggested to be mediated by bone morphogenetic protein (BMP)-like molecules recognized by antibodies against BMP-2/-4 and BMP-7 (Suzuki et al. 2005; Takayama et al. 2005). BMP-2 and BMP-7 stimulate mouse mesenchymal cells to differentiate toward osteoblasts (Zhu et al. 2004). BMP-2 secreted at basal level in mouse DF cells commits them to differentiate toward the

osteo-cementoblastic phenotype (Zhao et al. 2002) and increases the expression of cementum attachment protein (CAP) in human periodontal ligament cells (Pitaru et al. 2002). Enhanced periodontal regeneration by BMP-2 and -7 has also been demonstrated in animal models (Taba et al. 2005). During tooth development, BMP-2, BMP-4, and BMP-7 are synthesized not only by HERS cells (Yamamoto et al. 2004), but also by ameloblasts (Aberg et al. 1997) and differentiated cementoblasts (Yamashiro et al. 2003). Together, these data suggest that BMPs are involved in osteo-cementoblast differentiation, periodontal development, and wound healing.

Although accumulated data suggest that EMD and BMPs can induce DF progenitors to differentiate toward the cementoblast phenotype, the mechanisms involved remain to be clarified. In this study, we confirm that human DF cells have mesenchymal progenitor properties and can be stimulated by BMPs. Most importantly, we show, for the first time, that HDFC treated with EMD proceed to cementoblastic differentiation, an effect dependent on the presence of BMPs. In addition, we speculate that EMD exert BMP-independent effects on HDFC through signaling pathways dependent on Smad-1 and mitogen-activated protein kinases (MAPK). Our results provide new information regarding the effect of EMD and BMPs on cementoblast differentiation and suggest the potential of using new growth factors to target periodontal progenitors in the treatment of periodontitis.

Materials and methods

Materials

Monoclonal anti-BMP-2 and -7 antibodies, recombinant human BMPs (rhBMP-2 and rhBMP-7), rhNoggin, and transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3) were purchased from R&D System (Minneapolis, Minn., USA). EMD gel was obtained from Straumann (Basel, Switzerland). Anti-STRO-1 and anti-collagen II monoclonal antibodies were purchased from the Developmental Hybridoma Study Bank (Iowa City, Iowa, USA). Anti-phosphorylated Erk 1/2 and anti- β -actin antibodies were purchased from Sigma (St. Louis, Mo., USA). Rabbit polyclonal antibodies against bone sialoprotein (BSP) were a kind gift from Dr. L.W. Fisher (LF 83, National Institute of Dental and Craniofacial Research/National Institute of Health; Fisher et al. 1995). Rabbit polyclonal antibodies against peroxisome proliferator-activated receptors γ (PPAR γ) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif., USA). CD 13, 44, 45, 73 and HLA-LA class I conjugated antibodies were from Becton-Dickinson (Le Pont de Claix, France). The avidin-peroxidase conjugate ABC kit was from Vectastain Elite

(Burlingame, USA). Rabbit polyclonal antibodies against pSmad1, BMP receptors (BMPR)-Ia, -Ib, and -II and against activin Receptor 1 (ActR-1) were a kind gift from Drs. C.H. Heldin and P. TenDijke (Rosendahl et al. 2002). Preparation of the mouse monoclonal antibody against CAP and 3G9 and of the rabbit polyclonal antibody against cementum protein-23 (CP-23) were as previously described (Saito et al. 2001; Alvarez-Perez et al. 2006). IgG and IgM were from Serotec (Cergy Saint-Christophe, France). ITS-Premix was from BD-Biosciences (Bedford, Mass., USA). Penicillin, streptomycin, and phosphate-buffered saline (PBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal calf serum (FCS), and LO-PRO1 were from Invitrogen (Carlsbad, Calif., USA). The picogreen kit was from Molecular Probes (Carlsbad, Calif., USA). Mouse and rabbit horseradish-peroxidase-conjugated IgGs were from Cell Signaling (Beverly, Calif., USA) and Promega (Madison, Mich., USA) respectively. Chemoluminescence reagent was from ECL Covalab (Lyon, France). All other reagents were from Sigma.

Tissues

Healthy human impacted third molars (27 samples from 15 donors) and non-impacted premolars (8 samples from 2 donors) extracted for orthodontic reasons (patient ages: 12–17 years) were used. Material from 1–2 patients was usually pooled and supported one HDFC culture. For DF preparation, material surrounding healthy teeth at early onset of root development (as assessed by radiographic and clinical observation of the removed teeth) was dissected. The results from distinct preparations of HDFC or DF were similar. Written informed consent was obtained from the parents of the patients. This protocol was approved by the local ethical committee.

Cell culture

HDFCs were cultured from DF as previously reported (Morszeck et al. 2005). The surfaces of the follicle tissues were cleaned, rinsed in basal medium (DMEM containing 100 U/ml penicillin and 100 ng/ml streptomycin), and minced. The dental papilla tissue was discarded. Follicles were digested in a solution of 1 mg/ml bacterial collagenase type I in basal medium at 37°C for 1 h and centrifuged at 1,000 rpm for 5 min. Cells were seeded at a density of 5000 cells/cm² in basal medium containing 10% FCS at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Non-adherent cells were removed by a change of medium 24 h later. Adherent cells were continuously propagated until confluence. HDFC up to five passages were used for further experiments.

Primary human cementum-derived cells were isolated from non-impacted teeth and cultured as previously reported

(Grzesik et al. 1998). Briefly, after the periodontal ligament was manually dissected, each tooth was washed in basal medium. Cementum and a thin layer of underlying dentin were dissected and collected by using a sterile surgical scalpel. Fragments were placed in plastic tissue-culture dishes in basal medium with 10% FCS. Cells from these fragments reached sub-confluence in 3–4 weeks and were then cultured for 10 days in Dex-medium (basal medium with 1% FCS, 10 nM dexamethasone, and 50 µg/ml L-ascorbate 2-phosphate). These cells were considered to be differentiated human cementum-derived cells (HCDC).

Human bone-marrow stromal cells (HBMSC) and human osteoblasts (HOB) from bone fragments taken during surgical scoliosis correction of healthy patients were cultured in basal medium with 10% FCS. After reaching confluence, bone cells were cultured in Dex medium for 10 days. These cells were tested for the expression of specific bone markers (not shown). Chinese hamster ovary (CHO) cells (ATCC reference: CRL 1735) were cultured in basal medium with 10% FCS.

Tissue culture

DFs were rinsed in PBS with penicillin and streptomycin and cultured on human dentine slices previously demineralized with 5% citric acid for 30 s. They were maintained as ex vivo explants for 20 days in basal medium supplemented with 2% FCS, 50 ng/ml ascorbic acid, and 10 mM β-glycerolphosphate plus EMD (50 µg/ml) with or without rhNoggin (500 ng/ml) or vehicle (PBS) only. The medium was changed every day.

Cell differentiation

For osteogenic and adipogenic differentiation, HDFC were seeded at a density of 10⁵ cells/cm² and maintained in basal medium with 10% FCS until confluence. Cells were then cultured in osteogenic medium (Dex-medium) or in adipogenic medium (DMEM supplemented with 10 µM dexamethasone, 1 µg/ml insulin, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine) for 21 days. Control cultures were maintained without osteogenic or adipogenic supplements. To induce chondrogenic differentiation, cells were cultured for 21 days as pellets of 250×10³ in a serum-free expansion medium containing 0.1 µM dexamethasone, 50 µg/ml L-ascorbate-2-phosphate, 40 µg/ml L-proline, 100 µg/ml sodium pyruvate, 50 mg/ml ITS-Premix, and 10 ng/ml TGF-β3. Control pellet cultures were maintained without the addition of TGF-β3. Medium was renewed every 3 days.

To test the effects of rhBMP-2 and/or rhBMP-7, and EMD with or without rhNoggin, HDFC were seeded into 6-well plates at a density of 10⁵ cells/well, cultured in basal medium with 10% FCS until confluence, and then maintained in basal or differentiation medium (basal medium

with 1% FCS, 50 $\mu\text{g/ml}$ L-ascorbate-2-phosphate) and agonists as follows: rhBMP-2 or -7 (50 ng/ml), rhBMP-2 and -7 together (25 ng/ml each), EMD (50 $\mu\text{g/ml}$) with or without rhNoggin (500 ng/ml), or vehicle alone (PBS) for various time as indicated. Cells were used for immunofluorescence, Western blotting, or biochemical studies as described below.

Western blotting

HDPC were seeded into 6-well plates at a density of 3×10^4 cells/well and cultured in basal medium with 10% FCS for 2 days. On the day of the test, the medium was replaced by DMEM alone in the presence of agonists or vehicle as indicated. Cells were scraped out of the wells, resuspended in Laemli buffer (10% glycerol, 62.5 mM TRIS pH 6.8, 2% SDS, 0.2% bromophenol blue, 0.7 M β -mercaptoethanol), and disrupted by sonication. Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a Protran nitrocellulose membrane, which was saturated overnight in TRIS-buffered saline with Tween (TBST) and 5% low fat milk. The membrane was then incubated with anti-BMP-2 (1/500), anti-BMP-7 (1/1,500), anti-BSP (1/400), anti-PPAR γ (1/300), anti-CAP (1:2,000), anti-CP-23 (1/500), anti- β -actin (1:5,000), anti-phosphorylated Erk 1/2 (1:10,000), or anti-pSmad1 (1:1,000) antibodies and then with mouse or rabbit horseradish-peroxidase-conjugated IgG. Chemoluminescence reagent was used according to the manufacturer's recommendations.

Immunofluorescence studies

For analysis by fluorescence microscopy, cells were trypsinized, seeded on glass slide chambers (10^4 cells per 0.8 cm^2), and then cultured for a further 2 days in the same medium. The cells were subsequently fixed in 3.7% paraformaldehyde (PFA) for 15 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 5 min, blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 30 min, and then incubated with primary antibodies for 1 h. Antibodies were diluted 1:1 for anti-STRO-1, 1:1,000 for anti-CAP, 1:200 for anti-CP-23, and 1:100 for anti-BMPRs. Cells were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgM or IgG and/or AlexaFluor 633 goat anti-rabbit IgG for 1 h. Cell nuclei were stained with LO-PRO1 for 5 min. In negative controls, primary antibodies were replaced by an appropriate isotype-matched negative IgG or IgM. Fluorescence staining was visualized by confocal microscopy (Zeiss LSM 510).

Fluorescence-activated cell-sorting analysis

HDPC were incubated with 100 μl fluorescence-conjugated antibody or the isotype control IgG for 1 h at 4°C in PBS

containing 1% BSA and 0.01% sodium azide. Analysis of 5,000 events was performed in an Epics XL4C (Beckman-Coulter). Data were analyzed by WinMDI version 2.8 software.

Quantification of AP activity and DNA

After 5, 10, and 15 days in differentiation medium, HDPC layers were rinsed with PBS, scraped off into 50 mM TRIS-HCl pH 7.4, containing 0.1% Triton X-100 (Sigma), and sonicated for 1 min. AP activity was determined by the hydrolysis of p-nitrophenyl phosphate in 2-amino-2-methyl-1-propanolbuffer, pH 10.4, at 37°C for 30 min (Maniopoulos et al. 1988). DNA content was determined by using the picogreen kit according to recommendations of the manufacturer. AP activity was corrected for total DNA content and expressed as nanomoles of paranitrophenol per nanogram of DNA. Absorbance at 405 nm and fluorescence (excitation at 485 nm and emission at 535 nm) were measured with a spectrophotometer (Bio-Rad 3550 microplate Reader).

Mineralization assay

After 21 days in differentiation medium supplemented with 10 mM β -glycerophosphate, HDPC layers were rinsed with PBS. Calcium deposits were stained with 40 mM pH-4.2 Alizarin red (AR) according to the protocol described by Stanford et al. (1995). Briefly, cells were rinsed three times with PBS and then fixed in 3.7% PFA for 15 min. AR was added to the wells for 1 h and rinsed five times to avoid non-specific staining. Cells were treated with 10% (w/v) cetylpyridinium chloride in 10 mM sodium phosphate, pH 7.0, for 15 min at room temperature to remove the dye. The calcium concentration was determined by absorbance measurements at 562 nm with a spectrophotometer (Bio-Rad 3550 microplate Reader). Values were normalized to the total DNA content of non-AR-stained HDPC cultured under the same conditions.

Histochemical and immunohistochemical analysis

Histochemistry and immunoperoxidase staining was performed according to the procedure previously described (Saito et al. 2001; Alvarez-Perez et al. 2006). Briefly, freshly dissected DF, 20-day-cultured DFs, and cell pellets were fixed in 3.7% PFA. Tissues were embedded in paraffin and sectioned at $4 \mu\text{m}$. After paraffin removal with xylene and rehydration through descending ethanol series, sections were incubated in 10% H_2O_2 to neutralize endogenous peroxidase activity. Saturation of non-specific sites was achieved by incubating the sections in PBS/5% BSA for 1 h at room temperature. After overnight incubation at 4°C with primary antibodies diluted in PBS/2% BSA (1:100 for anti-

BMPRs antibodies, 1:300 for anti-CP-23 antibody, 1:1,000 for anti-CAP antibody, and 1:30 for the anti-collagen II antibody; the anti-STRO-1 antibody was used undiluted), sections were washed in PBS, blocked with 5% BSA in order to prevent non-specific binding of the secondary antibody, and incubated with specific biotinylated secondary antibodies for 1 h followed by avidin-peroxidase-conjugate treatment for 30 min at room temperature. Visualization was performed by using diaminobenzidine according to manufacturer's recommendations. Some sections were stained with Masson's trichrome, AR, or Alcian blue. Primary antibodies were omitted from the negative controls. For the staining of lipid droplets, HDFC cultured with or without adipogenic elements for 21 days were washed three times in PBS, fixed in 3.7% PFA for 15 min at room temperature, and rinsed in isopropanol 60%. Red oil was added to the cells for 10 min, after which they were washed four times with PBS. Stained cultures and tissues were photographed under a light microscope equipped with a Nikon Coolpix 4500 camera.

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SEM of triplicate values. Comparative studies were performed by using the non-parametric Mann Whitney test. Statistical significance was considered if $P < 0.05$.

Results

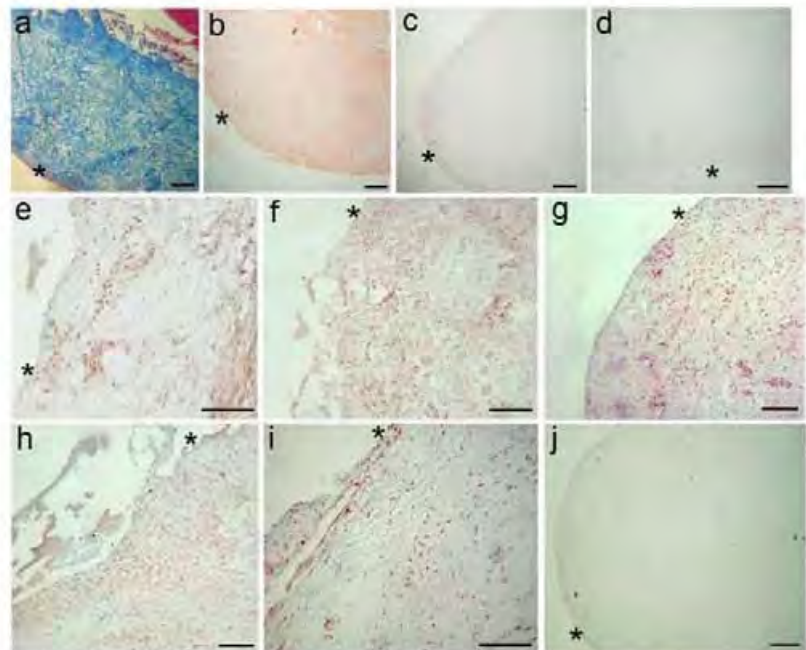
Histology and immunophenotype of DF

After isolation, the DF appeared as a mesenchymal tissue in which the stroma consisted of a number of collagenous fibers, with fibroblasts and small vessels (Fig. 1a). AR staining did not show calcification foci in the DF (Fig. 1b), and no immunoreactivity with CAP, CP-23 (Fig. 1c,d), or BSP antibodies was found (data not shown), suggesting the absence of differentiated cells in DF prior to the onset of root morphogenesis. STRO-1, a cell-surface antigen characteristic of multipotent mesenchymal cells present in bone marrow (Simmons and Torok-Storb 1991) was detected in DF (Fig. 1e). Furthermore, in sections of whole DFs, BMPR -Ia, -Ib, and -II and Actr-I were clearly localized (Fig. 1f i).

STRO-1/mesenchymal markers, BMPR expression, and multilineage differentiation of HDFC

In order to confirm that the isolated cultured HDFC displayed mesenchymal progenitor properties, STRO-1 expression was evaluated. Some HDFC were clearly STRO-1-positive (Fig. 2a). STRO-1 reactivity was also observed in HBMSC but not in CHO cultures used as positive and negative controls, respectively (Fig. 2b,c). Cells were then characterized according to the expression of

Fig. 1 Histology and immunophenotype of human dental follicle (DF) before the onset of root morphogenesis (asterisks inner border neighboring the former papilla). **a** Trichrome staining. **b** Alizarin red (AR) staining did not show calcification foci in the DF. **c–i** Sections were incubated with primary antibodies against CAP (**c**), CP-23 (**d**), STRO-1 (**e**), BMPR-Ia (**f**), BMPR-Ib (**g**), BMPR-II (**h**), and ActR-1 (**i**). Specific staining was detectable for all molecules in the connective tissue except for CAP and CP-23 proteins. Primary antibodies were omitted in the control (**j**). Bars 300 μ m



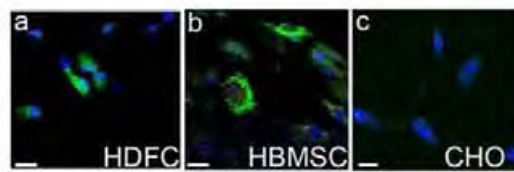


Fig. 2 STRO-1 expression by HDFC. STRO-1 antigen (green) was detected on some primary cultured HDFC (a) by using a FITC-conjugated secondary antibody (blue LO-PRO1 staining of nuclei). HBMSC (b) and CHO (c) cells were used as positive and negative controls, respectively. Bar 20 μ m

surface markers known to be expressed or absent in HBMSC. More than 95% of these cells were positive for CD 13, 44, 73, and HLA class I and negative for the expression of CD 45 in the fluorescence-activated cell-sorting (FACS) analysis (Fig. 3a–f). In order to test whether DF cells expressing STRO-1 were potential targets of BMPs, we analyzed the co-expression of STRO-1 and BMPRs in single cells by double-immunofluorescence labeling. As shown in Fig. 4, STRO-1-positive cells (Fig. 4a, d, g, j) expressed BMPR-Ia (Fig. 4b), BMPR-Ib (Fig. 4c), BMPR-II (Fig. 4h), and ActR-I (Fig. 4k), suggesting that DF precursor cells were stimulated by BMPs. In addition, HDFC did not express CAP, CP-23, or BSP proteins (data not shown), confirming the absence of differentiated cementoblastic cells in the HDFC cultures. To assess the multilineage potentialities of HDFC, they were submitted to various culture conditions. Under appropriate treatments,

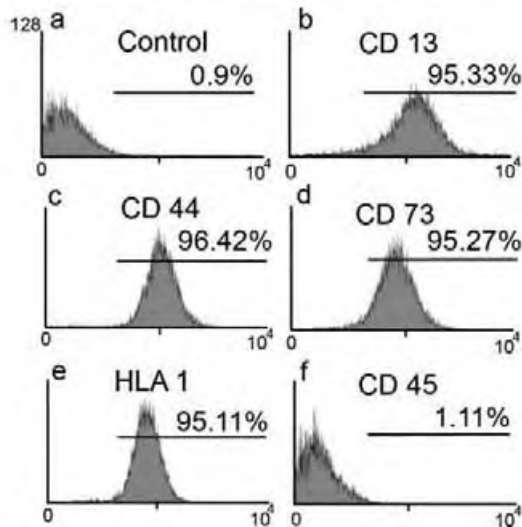


Fig. 3 Fluorescence-activated cell sorting analysis of HDFC. Cultured HDFC were positive for cell-surface markers CD 13, 44, 73, and HLA class I (b–e). The absence of CD 45 expression in the culture confirmed the absence of contamination by cells of the hematopoietic lineage (f)

Springer

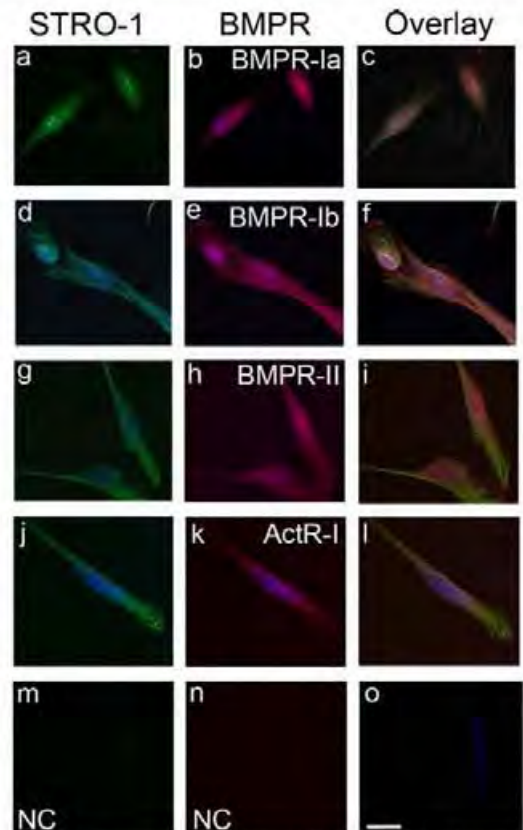


Fig. 4 Co-expression of STRO-1 and BMPR by HDFC. HDFC were cultured and incubated with primary antibodies against STRO-1, BMPR-Ia, -Ib, -II, or ActR-I. Staining was visualized by FITC-conjugated anti-mouse secondary antibody (green in a, d, g, j) or Alexafluor-633-conjugated anti-rabbit secondary antibody (red in b, e, h, k). Nuclei were stained with LO-PRO1 (blue). Negative controls (m, n, NC) were performed by replacing the primary antibody by an appropriate isotype-matched negative IgG or IgM. STRO-1-positive HDFC expressed all tested BMPRs (Overlay, yellow in c, f, i, l). Bar 10 μ m

HDFC differentiated toward multiple mesenchymal-derived cell types, such as calcified matrix cells (osteoblasts or cementoblasts; Fig. 5a,b,g), chondrocytes (Fig. 5c,d,h), or adipocytes (Fig. 5e,f,i) as demonstrated by specific staining and the expression of specific markers (BSP, collagen II, and PPAR γ , respectively).

EMD contain BMP-2/-7 proteins and induce their own expression by HDFC

In order to test whether BMPs are present in EMD, Western blot experiments were performed. Immunoreactive bands

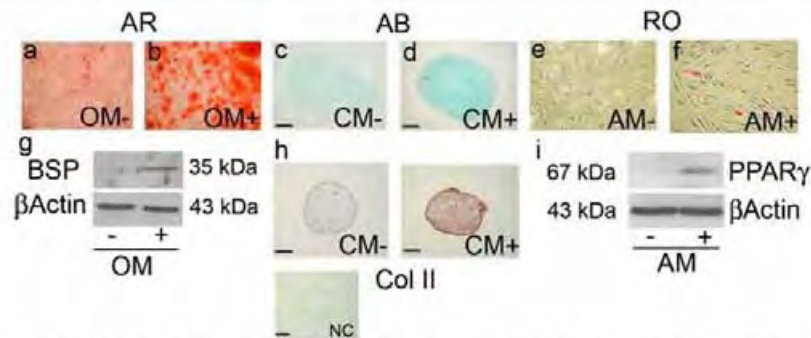


Fig. 5 Multilineage differentiation of HDFC. Alizarin red (AR, $\times 40$), Alcian blue (AB, $\times 100$), and red oil (RO, $\times 100$) staining clearly showed calcification foci, proteoglycan synthesis, and lipid droplets, respectively, when HDFC were cultured in osteogenic, chondrogenic, or adipogenic medium (OM, CM, AM, respectively; + presence, - absence; a–f).

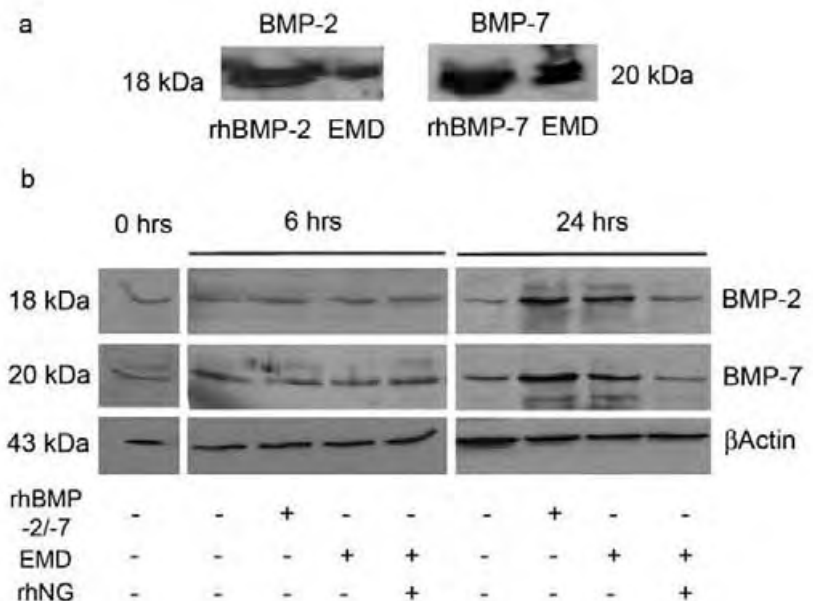
Osteogenic, chondrogenic, and adipogenic HDFC differentiation was confirmed by the expression of bone sialoprotein (BSP; g), collagen II (Col II; h), and peroxisome proliferator-activated receptors γ (PPAR γ ; i). Primary antibody was omitted in the negative control (NC). Bars 300 μ m.

of 18 and 20 kDa were detected by using anti-BMP-2 and anti-BMP-7 antibodies, respectively (Fig. 6a). Slight basal expression of BMP-2 and BMP-7 was detected in unstimulated HDFC and in HDFC after 6 h of treatment with EMD or rhBMP-2 and rhBMP-7. An increase of BMP-2 and BMP-7 was detected after 24 h of stimulation of HDFC (Fig. 6b). RhNoggin blocked the 24-h EMD-stimulated expression of BMP-2 and BMP-7.

BMP-2 and/or BMP-7 and EMD induce AP activity and mineralization in HDFC

To investigate the potential of HDFC to undergo osteoblastic or cementoblastic differentiation and matrix mineralization during EMD and BMP treatment, we assessed AP activity and calcium deposition in these cells. Stimulation with rhBMP-2 and/or rhBMP-7 and with EMD significant-

Fig. 6 Presence of BMP-2 and BMP-7 in EMD and expression by HDFC. **a** Western blot experiments showed the presence of rhBMP-2 (18 kDa) and rhBMP-7 (20 kDa) in EMD. **b** Time course experiments of BMP-2/7 expression in HDFC. After being cultured in serum-free medium, HDFC were stimulated for 6 or 24 h in basal medium with (+) or without (–) rhBMP-2 and BMP-7 (25 ng/ml each), EMD (50 μ g/ml) with or without rhNoggin (NG, 500 ng/ml), or vehicle (PBS). Detection of BMP-2 and BMP-7 was more intense after 24-h stimulation with EMD or rhBMP-2 and rhBMP-7. EMD-stimulated increase was blocked by rhNoggin



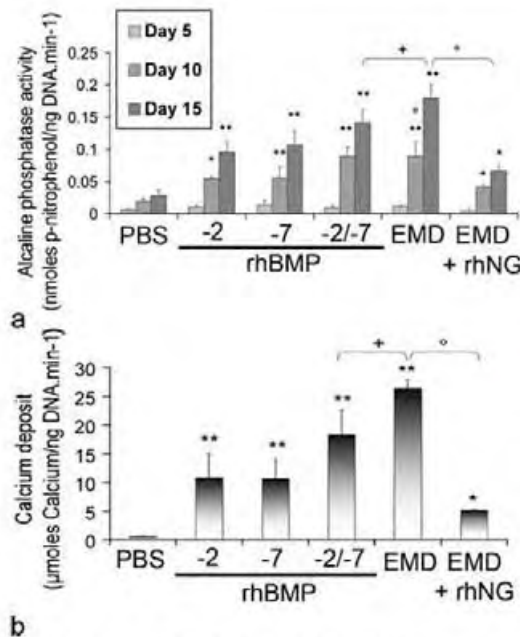


Fig. 7 Effects of BMP-2 and/or BMP-7 and EMD on alkaline phosphatase (AP) activity and mineralization of HDFC. **a** AP activity in HDFC after 5, 10, and 15 days in the presence of differentiation medium with rhBMP-2 or rhBMP-7 (50 ng/ml), rhBMP-2 plus rhBMP-7 (BMP-2/-7, 25 ng/ml each), EMD (50 µg/ml) with or without rhNoggin (rhNG, 500 ng/ml), or vehicle alone (PBS). From day 10, incubation with rhBMP-2 or rhBMP-7 alone had a moderate effect on AP activity in HDFC, whereas treatment of HDFC with rhBMP-2 plus rhBMP-7 (BMP-2/-7) and with EMD strongly enhanced AP activity in a time-dependent manner compared with the control. Incubation of HDFC with rhNoggin partially inhibited the EMD-induced AP activity. **b** Quantification of mineral salts produced by HDFC after 21 days of stimulation in the presence of differentiation medium, β -glycerophosphate (10 mM), and agonist or vehicle as described in **a**. At day 21, calcium deposits by HDFC stimulated with rhBMP-2 or rhBMP-7 were moderate but strong when stimulated with rhBMP-2 plus rhBMP-7 (BMP-2/-7) or EMD, compared with the control. Incubation of HDFC with rhNoggin incompletely inhibited EMD-induced mineralization. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ compared with control (PBS), * $P < 0.05$ when EMD-stimulated cultures were compared with cultures stimulated with EMD plus rhNoggin (EMD + rhNG), * $P < 0.05$ when EMD-stimulated cultures were compared with cultures stimulated with rhBMP-2 plus rhBMP-7 (BMP-2/-7)

ly enhanced AP activity of HDFC in a time-dependent manner (3.3-fold, 4.1-fold, and 6.8-fold increase for rhBMP-2, rhBMP-7, and both rhBMP-2 and rhBMP-7, respectively, and 9.3-fold for EMD at day 15; $P < 0.001$ compared with control cultures; Fig. 7a). This increase was significant after day 10. AP activity was significantly more important during EMD treatment compared with BMP-2/-7 treatment ($P < 0.05$). We next examined the effect of rhNoggin, a BMP antagonist, on EMD-treated cells. Incubation of

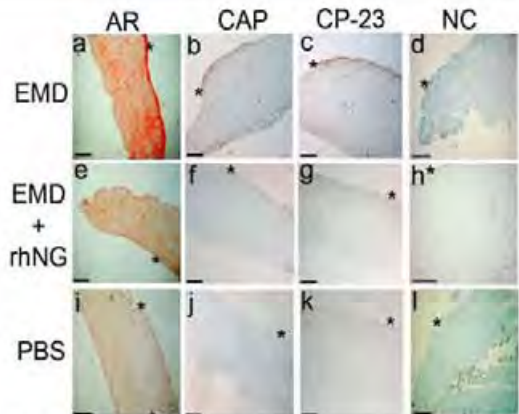


Fig. 8 Alizarin staining (AR) and immunolocalization of CAP and CP-23 in ex vivo cultured DF. DFs were prepared and cultured for 20 days in differentiation medium plus 10 mM β -glycerophosphate either in the presence of 50 µg/ml EMD with or without 500 ng/ml rhNoggin (rhNG) as indicated, or with vehicle (PBS) alone. Only EMD-stimulated DFs exhibited considerable amounts of calcification foci (a). CAP and CP-23 were strongly detected on EMD-treated DFs in the absence of rhNoggin (b, c), especially on the inner border neighboring the former papilla (asterisks). Primary antibodies were omitted in the negative control (NC). Bars 300 µm

HDFC with rhNoggin partially inhibited (by 65%) EMD-induced AP activity after 10 days of stimulation (Fig. 7a; $P < 0.05$), suggesting that the increase of AP activity induced by EMD was partially mediated through BMP components.

We analyzed calcium deposits induced by BMP and EMD in HDFC by AR staining quantification. At day 21, calcium deposits were significantly increased in HDFC stimulated with all the factors tested, compared with controls (Fig. 7b). Co-treatment with rhBMP-2 and rhBMP-7 and treatment with EMD induced a 9-fold and 13-fold significant increase, respectively, when compared with the control group ($P < 0.001$), and were themselves significantly different ($P < 0.05$). Addition of rhNoggin to the medium partially inhibited (by 80%) the EMD-induced matrix mineralization in HDFC cultures confirming the involvement of BMPs under these conditions ($P < 0.05$; Fig. 7b).

DF and HDFC express cementoblast markers in the presence of BMP-2/-7 and EMD

To further determine whether EMD regulated the cementoblastic differentiation of human DF, we used an ex vivo DF culture system. After 20 days of culture, only EMD-stimulated DFs exhibited numerous calcification foci (Fig. 8a) and were strongly reactive with CAP (Fig. 8b) or CP-23 (Fig. 8c) antibodies and with BSP and BMP-2

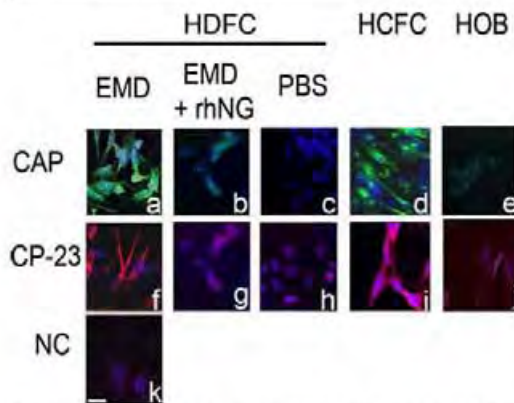


Fig. 9 Immunofluorescence detection of CAP (green) and CP-23 (red) expression in EMD-stimulated HDFC (blue LO-PRO1 staining of nuclei). Cells were stimulated for 12 days with EMD with or without rhNoggin (NG) or were treated with vehicle (PBS) alone. CAP and CP-23 were strongly detected in EMD-treated HDFC compared with other treatments (a–c, f–h). Human cementum-derived cells (HCDC) and human osteoblasts (HOB) were used as positive and negative controls of marker expression, respectively (d, e, i, j). Negative controls (NC; k) were performed by replacing the primary antibody by an appropriate isotype-matched negative IgG. Bar 20 μ m

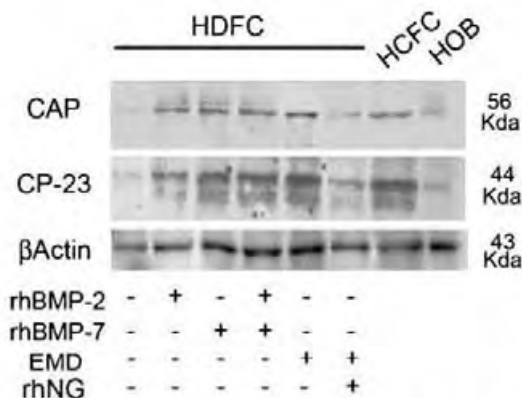


Fig. 10 Western blot analysis of the expression of CAP and CP-23 by HDFC during EMD and BMP-2/-7 stimulation. HDFC were cultured for 12 days in differentiation medium in the presence (+) or absence (-) of rhBMP-2 or rhBMP-7 (50 ng/ml), rhBMP-2 plus rhBMP-7 (25 ng/ml each), or EMD (50 μ g/ml) with or without rhNoggin (NG, 500 ng/ml), or were treated with vehicle (PBS) alone. EMD-stimulated HDFC strongly expressed CAP and CP-23. Marker expression was almost completely abolished by adding rhNoggin together with EMD. HCDC and HOB were used as positive and negative controls, respectively. Protein loading, as assessed by the β -actin expression, showed equal amounts of material and was tested between the conditions

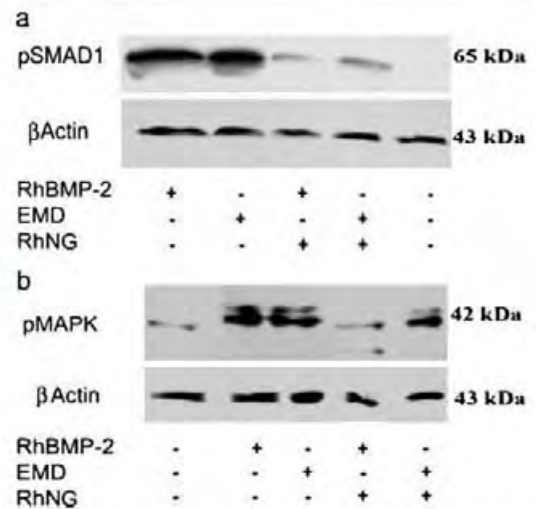


Fig. 11 Activation of Smad (a) and MAPK (b) signaling pathways by EMD. Cultured HDFC were stimulated with EMD and phosphorylated Smad-1 and MAPK were visualized by Western blot. EMD (50 μ g/ml) induced both phosphorylation of Smad1 (a, 30 min) and MAPK (b, 15 min) in HDFC. RhNoggin (500 ng/ml) inhibited Smad1 phosphorylation but not MAPK phosphorylation. The positive control corresponds to stimulation with rhBMP-2 (30 min, 50 ng/ml)

antibodies (not shown). Immunostaining was particularly strong on the inner border neighboring the former papilla. Mineralization process and expression of cementoblast markers were abolished in EMD-treated HDFC when 500 ng/ml rhNoggin was added (Fig. 8e, g).

All HDFC were immunopositive for CAP and CP-23 (Fig. 9a, f) and for BSP and BMP-2 (not shown) when stimulated for 12 days with EMD. Detection of CAP and CP-23 was clearly inhibited by rhNoggin treatment (Fig. 9b, g). HDFC stimulated with EMD or BMP-2 and/or -7 strongly expressed CAP and CP-23 proteins as assessed by Western blot experiments (Fig. 10). Their expression decreased when rhNoggin was added with EMD (Fig. 10).

Both markers were strongly expressed in HCDC, but weakly in HOB, used as positive and negative controls, respectively.

Activation of Smad and MAPK pathways by HDFC

To determine whether EMD could trigger BMP-specific intracellular signaling pathways, cultured HDFC were stimulated with EMD, and phosphorylated Smad-1 and MAPK were detected by Western blot analysis. As shown in Fig. 11a, Smad-1 phosphorylation occurred after 30 min of EMD or BMP-2 stimulation (positive control). As expected, the addition of rhNoggin completely abolished Smad-1 phosphorylation (Fig. 11a). Interestingly, MAPK

were also activated after 15 min of EMD stimulation but were not clearly inhibited by rhNoggin (Fig. 11b).

Discussion

Cementum matrix is secreted by highly differentiated cells called cementoblasts. The precise nature of the DF cells that give rise to periodontal cells and the molecular mechanisms that trigger this process are not well known. This study reports, for the first time, that EMD and BMPs play a crucial role in the differentiation of human dental follicle cells toward the cementoblast phenotype, at the initiation of root morphogenesis.

HDfC emerging from DF have recently been shown to stain positively for Nestin and Notch, two progenitor markers of undifferentiated cells such as neural stem cells (Morszczek et al. 2005). We report here, for the first time, that HDfC express a well-known marker of bone marrow and adipose tissue mesenchymal precursor cells, viz., STRO-1. STRO-1 is a trypsin-resistant cell-surface antigen that is present on human and mouse mesenchymal progenitor cells, both in vivo and in vitro. Similar observations have been made in the human periodontal ligament, which is thought to contain adult periodontal progenitors (Seo et al. 2004) able to regenerate periodontal tissues (for a review, see Bartold et al. 2006). Expression of STRO-1 by first-passage HDfC from independent donors shows that DF contain a mean of 6.75 ± 0.5 positive cells ($n=4$); these results are in agreement with a previously reported proportion of colony-forming units derived from primary HDfC cultures (Morszczek et al. 2005). Moreover, FACS analysis has demonstrated that HDfC express the same surface markers as HBMSC (CD 13, 44, 73, and HLA class I) and are CD-45-negative (excluding a culture contamination by adherent cells of the hematopoietic lineage). In our experiments, human DF taken before the onset of the root development exhibit no calcified matrix, and DF cells do not express osteo-cementoblastic markers; this suggests that most of the HDfC cultured here remain in an undifferentiated state and might constitute progenitor cell pools. In agreement with these observations, we have, in our assessment of the multilineage potentialities of HDfC, successfully performed cultures oriented toward mineralized-matrix cells (osteoblastic or cementoblastic) and chondroblastic and adipocyte phenotypes. Together, these observations suggest that populations of DF cells have mesenchymal progenitor features.

Several authors have suggested the use of EMD for periodontal regeneration. In vitro, EMD enhance the expression of calcified-matrix markers in mouse periodontal or bone marrow mesenchymal cells and in human adult periodontal ligament cells (Hakki et al. 2001; Keila et al.

2004). However, the effects of EMD on HDfC differentiation are unknown. Our results provide evidence that AP and calcium deposits (and the expression of BMP-2 and BSP) are increased by the addition of EMD to the culture medium. Moreover, these effects are shared by osteoblastic and cementoblastic phenotypes. Most importantly, we show here that EMD up-regulate the expression of CAP and CP-23 (Genbank accession AY455942 and AY584596) by HDfC. These two molecules are known to be highly synthesized in cementoblasts compared with other periodontal and non-periodontal cells (Arzate et al. 2002; Alvarez-Perez et al. 2006). As most HDfC express CAP and CP-23 markers under these conditions, we suggest that EMD treatment differentiates HDfC toward the cementoblast phenotype rather than the osteoblast phenotype. Interestingly, maximal CAP and CP-23 immunostaining is detected near the root border side in cultured DF, a region in which cementoblast progenitors are thought to be localized at the onset of periodontal development.

Recent reports have indicated that BMP-like growth factors are present in EMD extracts (Suzuki et al. 2005). The data reported herein confirm the presence of BMP-2 and BMP-7 proteins in the EMD. These results are in agreement with those of Takayama et al. (2005) who have used another antibody source. Furthermore, we have observed that BMP-2 and BMP-7 are overexpressed by HDfC after 24 h of EMD or BMP-2/-7 stimulation. The antagonizing effect of rhNoggin in EMD medium suggests that BMP components of EMD may act to induce a paracrine loop. We therefore tested these factors in our culture model. Our data suggest that the EMD effects on HDfC differentiation can be mimicked by the association of rhBMP-2 and rhBMP-7. Inductions of CAP and CP-23 expression are up-regulated by BMP-2 (as previously shown in human periodontal fibroblasts; Pitaru et al. 2002) and/or by BMP-7, and by EMD. AP activity and mineralization moderately increases under rhBMP-2 or rhBMP-7 treatment alone and strongly increases toward EMD-induced levels in HDfC stimulated with both factors, suggesting a higher efficiency of the BMP-2/-7 association on cementoblast matrix deposition and mineralization. Our results are in accord with recent data reporting the combined effect of BMP-2 and BMP-7 on osteoblastic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal cells (Zhu et al. 2004). Hence, STRO-1-positive HDfC co-express BMPR-1a, -1b, -II, and ActR-1 and can therefore be considered as BMP-responsive progenitors. Moreover, the decrease of cementoblast marker expression during rhNoggin treatment in EMD-stimulated cells reinforces the hypothesis that the BMP pathway is also involved in cementogenesis. These data confirm that EMD activities are mediated by biologically active BMPs, as previously shown (Iwata et al. 2002). Notably, incubation of HDfC in adipogenic medium

in the presence of rhNoggin does not inhibit adipocyte differentiation, whereas a deleterious effect of rhNoggin has been observed on the development of chondrogenic pellets (results not shown).

EMD treatment increases phosphorylated Smad-1 level, the initial intra-cytosolic factor of the canonical BMP signaling pathway (Takayama et al. 2005). It also activates the MAPK signaling pathway, as previously reported (Matsuda et al. 2002), another important cascade involved in cell proliferation and differentiation. Although BMPs can activate the MAPK pathway, the addition of rhNoggin to EMD in the culture medium abolishes Smad-1 phosphorylation, but not that of Erk 1/2. These results suggest that EMD also contain non-BMP signaling molecules that may activate other pathways, possibly through tyrosine kinase receptors (Matsuda et al. 2002). This hypothesis is reinforced by the incomplete inhibition of EMD-induced HDFC differentiation when BMPs in the medium are blocked. Consequently, factors present in EMD, other than BMP, lead to the activation of non-Smad-dependent pathways, such as MAPK signalization, in HDFC differentiation. Among them, amelogenins, which are largely present in EMD and have previously been shown to act as growth factor (Veis et al. 2000), might be good candidates. A synthetic form of amelogenin has recently been shown to bind to LAMP-1, originally identified as a lysosomal membrane protein that is also found at the cell surface, suggesting that amelogenins also enter cells via clathrin-coated pits (Tompkins et al. 2006). The proper role of amelogenins in periodontal development and regeneration remains questionable, even if the observation that amelogenin-null mice have abnormal cementum suggests that amelogenins play a role in cementogenesis (Viswanathan et al. 2003). Because the biological effects of recombinant amelogenins on the expression of extra-cellular matrix makers of periodontal cells and in vitro wound healing show discrepancies compared with EMD (Shimizu et al. 2005; Tompkins and Veis 2002; Swanson et al. 2006; Chong et al. 2006), amelogenin might not be able to “summarize” the biological action of EMD. Future studies are needed to identify the part that other non-BMP components present in EMD play in cell differentiation (Suzuki et al. 2005). Our data indicate that BMPs present in EMD are probably crucial for the differentiation of HDFC into cementoblasts, in which Smad-1 and MAPK pathways seem to be involved. The HDFC differentiation model appears appropriate for additional studies exploring the role played by various growth factors, such as recombinant amelogenins, also present in EMD.

In conclusion, Ten Cate (1997) has postulated that DF precursors remain in adult PDL. During the periodontal development, the DF compartment is progressively replaced by PDL. Our data show that HDFC exhibit properties similar

to the mesenchymal progenitor cells present in adult PDL (Seo et al. 2004). In view of such an involvement of BMPs in periodontal development (especially in cementoblastic differentiation), their use in periodontal treatment seems rational. A better understanding of the molecular mechanisms that stimulate cementoblast differentiation should help to improve the outcome of regenerative periodontal therapies.

Acknowledgments The authors are grateful to Dr. P. TenDijke (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands) and Dr. C. Heldin (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden) for providing pSmad1 antibody, and to Dr. Larry Fisher (NIH, NIDCR, Craniofacial and Skeletal Diseases Branch, Bethesda, Maryland) for providing BSP antibody. STRO-1 antibody was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank (Dr. K. Jensen). HBMS were the kind gift of Dr. P. Bourin (Etablissement Français du Sang, Toulouse, France). Dental follicles were kindly provided by Drs. F. Vaysse and B. Courtois (Faculty of Odontology, University Paul-Sabatier, Toulouse, France). The authors also thank M. Mus and A. Bros for helping with experiments.

References

- Aberg T, Wozney J, Thesleff I (1997) Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev Dyn* 210:383–396
- Alvarez-Perez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodriguez Carmona B, Arzate H (2006) Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone* 38:409–419
- Arzate H, Jimenez-Garcia LF, Alvarez-Perez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S (2002) Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein. *J Dent Res* 81:541–546
- Bartold PM, Shi S, Gronthos S (2006) Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontology* 40:164–172
- Bosshardt DD, Schroeder HE (1996) Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. *Anat Rec* 245:267–292
- Bosshardt DD, Sculean A, Windisch P, Pjetursson BE, Lang NP (2005) Effects of enamel matrix proteins on tissue formation along the roots of human teeth. *J Periodontol Res* 40:158–167
- Chong CH, Cames DL, Moritz AJ, Oates T, Ryu OH, Simmer J, Cochran DL (2006) Human periodontal fibroblast response to enamel matrix derivative, amelogenin, and platelet-derived growth factor-BB. *J Periodontol* 77:1242–1252
- Fisher LW, Stubbs JT 3rd, Young MF (1995) Antisera and cDNA probes to human and certain animal model bone matrix non-collagenous proteins. *Acta Orthop Scand Suppl* 266:61–65
- Gestrelus S, Andersson C, Lidstrom D, Hammarstrom L, Somerman M (1997) In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol* 24:685–692
- Grzesik WJ, Kuznetsov SA, Uzawa K, Mankani M, Robey PG, Yamauchi M (1998) Normal human cementum-derived cells: isolation, clonal expansion, and in vitro and in vivo characterization. *J Bone Miner Res* 13:1547–1554
- Hakki SS, Berry JE, Somerman MJ (2001) The effect of enamel matrix protein derivative on follicle cells in vitro. *J Periodontol* 72:679–687
- Iwata T, Morotome Y, Tanabe T, Fukae M, Ishikawa I, Oida S (2002) Noggin blocks osteoinductive activity of porcine enamel extracts. *J Dent Res* 81:387–391

- Keila S, Nemcovsky CE, Moses O, Artzi Z, Weinreb M (2004) In vitro effects of enamel matrix proteins on rat bone marrow cells and gingival fibroblasts. *J Dent Res* 83:134–138
- Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH (1988) Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 254:317–330
- Matsuda N, Horikawa M, Watanabe M, Kitagawa S, Kudo Y, Takata T (2002) Possible involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in mitogenic response of periodontal ligament cells to enamel matrix derivative. *Eur J Oral Sci* 110:439–444
- Morsczek C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C, Sippel C, Hoffmann KH (2005) Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 24:155–165
- Pitaru S, Pritzki A, Bar-Kana I, Grosskopf A, Savion N, Narayanan AS (2002) Bone morphogenetic protein 2 induces the expression of cementum attachment protein in human periodontal ligament clones. *Connect Tissue Res* 43:257–264
- Rincon JC, Xiao Y, Young WG, Bartold PM (2005) Enhanced proliferation, attachment and osteopontin expression by porcine periodontal cells exposed to Emdogain. *Arch Oral Biol* 50:1047–1054
- Rosendahl A, Pardali E, Speletas M, Ten Dijke P, Heldin CH, Sideras P (2002) Activation of bone morphogenetic protein/Smad signaling in bronchial epithelial cells during airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:160–169
- Saito M, Iwase M, Maslan S, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, Takahashi O, Sato S, Kawase T, Teranaka T, Narayanan AS (2001) Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* 29:242–248
- Saito M, Handa K, Kiyono T, Hattori S, Yokoi T, Tsubakimoto T, Harada H, Noguchi T, Toyoda M, Sato S, Teranaka T (2005) Immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and TERT. *J Bone Miner Res* 20:50–57
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364:149–155
- Shimizu E, Saito R, Nakayama Y, Nakajima Y, Kato N, Takai H, Kim DS, Arai M, Simmer J, Ogata Y (2005) Amelogenin stimulates bone sialoprotein (BSP) expression through fibroblast growth factor 2 response element and transforming growth factor-beta1 activation element in the promoter of the BSP gene. *J Periodontol* 76:1482–1489
- Simmons PJ, Torok-Storb B (1991) Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78:55–62
- Slavkin HC, Bringas P Jr, Bessem C, Santos V, Nakamura M, Hsu MY, Snead ML, Zeichner-David M, Fincham AG (1989) Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically-defined medium. *J Periodontol Res* 24:28–40
- Spahr A, Hammarstrom L (1999) Response of dental follicular cells to the exposure of denuded enamel matrix in rat molars. *Eur J Oral Sci* 107:360–367
- Stanford CM, Jacobson PA, Eanes ED, Lembke LA, Midura RJ (1995) Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). *J Biol Chem* 270:9420–9428
- Suzuki S, Nagano T, Yamakoshi Y, Gomi K, Arai T, Fukae M, Katagiri T, Oida S (2005) Enamel matrix derivative gel stimulates signal transduction of BMP and TGF- β . *J Dent Res* 84:510–514
- Swanson EC, Fong HK, Foster BL, Paine ML, Gibson CW, Snead ML, Somerman MJ (2006) Amelogenins regulate expression of genes associated with cementoblasts in vitro. *Eur J Oral Sci* 114 (Suppl 1):239–243
- Taba M Jr, Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV (2005) Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod Craniofac Res* 8:292–302
- Takayama T, Suzuki N, Narukawa M, Tokunaga T, Otsuka K, Ito K (2005) Enamel matrix derivative stimulates core binding factor α 1/Runx2-related transcription factor-2 expression via activation of Smad1 in C2C12 cells. *J Periodontol* 76:244–249
- Ten Cate AR (1997) The development of the periodontium—a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontol* 13:9–19
- Tompkins K, Veis A (2002) Polypeptides translated from alternatively spliced transcripts of the amelogenin gene, devoid of the exon 6a, b, c region, have specific effects on tooth germ development in culture. *Connect Tissue Res* 43:224–231
- Tompkins K, George A, Veis A (2006) Characterization of a mouse amelogenin [A-4]/M59 cell surface receptor. *Bone* 38:172–180
- Van der Pauw MT, Van den Bos T, Everts V, Beertsen W (2000) Enamel matrix-derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor beta1 release of periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontol* 71: 31–43
- Veis A, Tompkins K, Alvares K, Wei K, Wang L, Wang XS, Brownell AG, Jeng SM, Healy KE (2000) Specific amelogenin gene splice products have signaling effects on cells in culture and in implants in vivo. *J Biol Chem* 275:41263–41272
- Viswanathan HL, Berry JE, Foster BL, Gibson CW, Li Y, Kulkarni AB, Snead ML, Somerman MJ (2003) Amelogenin: a potential regulator of cementum-associated genes. *J Periodontol* 74:1423–1431
- Yamamoto H, Cho SW, Kim EJ, Kim JY, Fujiwara N, Jung HS (2004) Developmental properties of the Hertwig's epithelial root sheath in mice. *J Dent Res* 83:688–692
- Yamashiro T, Tummers M, Thesleff I (2003) Expression of bone morphogenetic proteins and *Msx* genes during root formation. *J Dent Res* 82:172–176
- Zhao M, Xiao G, Berry JE, Franceschi RT, Reddi A, Somerman MJ (2002) Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res* 17:1441–1451
- Zhu W, Rawlins BA, Boachie-Adjei O, Myers ER, Arimizu J, Choi E, Lieberman JR, Crystal RG, Hidaka C (2004) Combined bone morphogenetic protein-2 and -7 gene transfer enhances osteoblastic differentiation and spine fusion in a rodent model. *J Bone Miner Res* 19:2021–2032